

Université de Sherbrooke

DÉTECTION, QUANTIFICATION ET IDENTIFICATION DU
CAMPYLOBACTER DANS L'EAU ENVIRONNEMENTALE DE L'ESTRIE

par

KAREN ST-PIERRE

Département de microbiologie et infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie

20 Mars 2009

Évaluateurs :

Sophie Michaud, département de microbiologie et infectiologie

Eric Frost, département de microbiologie et infectiologie

Louis-Charles Fortier, département de microbiologie et infectiologie

Carole Beaulieu, département de biologie, Université de Sherbrooke



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-53428-1
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-53428-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

« Fais de ta vie un rêve et d'un rêve, une réalité »

Antoine de Saint-Exupéry

« L'expérience est le nom que l'on donne à la somme de nos erreurs »

Antoine de Saint-Exupéry

« La plus grande gloire n'est pas de ne jamais tomber, mais de se relever à chaque chute »

Confucius

À mes parents, pour leurs encouragements et leur dévouement.

À Alexandre, pour son amour et son inspiration.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	VI
Liste des tableaux	VI
Liste des figures	VIII
LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	XII
RÉSUMÉ	XIV
INTRODUCTION	17
Le <i>Campylobacter</i>	17
La campylobactériose humaine	18
Les facteurs de risques	20
L'eau comme facteur de risque	20
Les outils de prévention utilisés	21
Le projet	23
CHAPITRE 1	26
Avant-propos de l'article	26
Résumé de l'article	27
« Thermotolerant coliforms are not a good surrogate for <i>Campylobacter</i> in environmental water »	29
« Abstract »	30
« Introduction »	31
« Materials and methods »	33
« Results »	40

« Discussion »	57
« Acknowledgments »	62
« References »	63
CHAPITRE 2	71
Approche moléculaire pour l'identification de 5 espèces de <i>Campylobacter</i> par PCR hippurate, PCR 16S et PCR- RFLP	71
Introduction	71
Matériels et méthodes	81
Résultats	90
Discussion et conclusion	104
Perspectives	111
CHAPITRE 3	113
Développement d'une PCR en temps réel semi- quantitative pour <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Campylobacter</i> <i>coli</i> et <i>Campylobacter lari</i> dans l'eau	113
Introduction	113
Matériels et méthodes	125
Résultats	139
Discussion et conclusion	153
Perspectives	161
CONCLUSION	164
REMERCIEMENTS	168
RÉFÉRENCES	171

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des tableaux

Table 1 : Comparison of culture and 16S rDNA PCR for detecting <i>Campylobacter</i> spp. in 2000-ml, 500-ml and 10-ml water samples.	42
Table 2 : Observed frequency of combinations of positive water subsamples among the 2481 water samples tested for <i>Campylobacter</i> spp. and the mean and 95% confidence limits of MPN/L calculated using the 1 x 2000 ml, 1 x 500 ml and 3 x 10 ml volumes.	44
Table 3 : Seasonal variation in presence and most probable number (MPN) of <i>Campylobacter</i> spp. at all sampling sites.	48
Tableau 4 : Caractéristiques phénotypiques générales et quelques divergences phénotypiques possibles pour l'identification à l'espèce des 5 principales espèces de <i>Campylobacter</i> d'intérêt médical et ce, avec l'utilisation des 6 tests biochimiques de routine.	73

Tableau 5 : Identification à l'espèce des 5 souches de <i>Campylobacter</i> en fonction des tests biochimiques, de la PCR hippurate, de la PCR 16S et de la PCR-RFLP.	95
Tableau 6 : Détails de l'identification à l'espèce des 1157 isolats et 5 souches de <i>Campylobacter</i> analysés seulement en fonction des 14 profils de digestion obtenus par PCR-RFLP.	101
Tableau 7 : Évaluation de la différence du logarithme ₁₀ du nombre de cellules moyen de <i>C. jejuni</i> obtenu après 10, 15 ou 20 h d'enrichissement dans le bouillon Preston, selon que l'inoculum initial théorique soit de 100 bactéries ou de 1000 bactéries et ce, pour chaque condition de stress testée.	143
Tableau 8 : Temps de génération issus de la courbe de croissance de cellules de l'isolat de <i>C. jejuni</i> ayant préalablement subis différents stress.	144
Tableau 9 : Spécificité et reproductibilité de la RT-PCR obtenues après 3 essais.	146
Tableau 10 : Comparaison de la quantification du <i>Campylobacter</i> obtenue par la méthode MPN, la qRT-PCR et l'extraction d'ADN directe sur membrane filtrante.	151

Liste des figures

- Figure 1 :** Geographic locations of the 32 sampling sites among the 7 counties of the Eastern Townships, Québec, Canada. 34
- Figure 2 :** Prevalence of *Campylobacter* spp. and thermotolerant coliforms per week, for the first year of the study (July 17, 2005 to July 09, 2006) and for the second year (July 16, 2006 to July 08, 2007). 46
- Figure 3 :** Percent of total samples in each water quality class (as defined by thermotolerant coliform (TTC) count level) and percent of samples in each water quality class positive for *Campylobacter* spp. 50
- Figure 4 :** Proportion of samples in each thermotolerant coliform count level according to the *Campylobacter* spp. count category. 52
- Figure 5 :** Distribution of positive site samples for *Campylobacter* spp., thermotolerant coliforms (TTC) and *E. coli* at various levels of water temperature. 54

Figure 6 : Distribution of positive site samples for <i>Campylobacter</i> spp., thermotolerant coliforms (TTC) and <i>E. coli</i> at various levels of water turbidity.	56
Figure 7 : Deux tests biochimiques de routine dont l'interprétation subjective, faite par une personne non-initiée ou peu attentive, peut fausser l'identification à l'espèce du <i>Campylobacter</i> .	77
Figure 8 : Visualisation des 14 profils de digestion de la PCR-RFLP sur gel d'agarose à 3%.	92
Figure 9 : Association des isolats de <i>Campylobacter</i> donnant un résultat positif à la PCR hippurate avec un profil de digestion par PCR-RFLP.	97
Figure 10 : Association des isolats de <i>Campylobacter</i> donnant un résultat négatif à la PCR hippurate avec un profil de digestion par PCR-RFLP.	99
Figure 11 : Algorithme décisionnel proposé pour l'identification à l'espèce des isolats de <i>Campylobacter</i> en fonction de l'approche moléculaire (PCR hippurate, PCR 16S et PCR-RFLP).	105

Figure 12 : Création d'une courbe standard permettant de convertir un Ct en nombre de copies d'un fragment d'ADN cible. 118

Figure 13 : Répartition d'une série de 12 tubes coniques selon les différentes conditions de stress initiales créées en variant la température et la durée d'incubation dans les 6 bouteilles d'eau et ce, avant d'ensemencer les bouillons d'enrichissement avec 100 ou 1000 bactéries provenant de ces bouteilles. 127

Figure 14 : Emplacement des amorces OT1559 et 18-1 décrites par PERELLE *et al.*, 2004 par rapport aux nouvelles amorces 16SCampF et 16SCampR construites pour la qRT-PCR précédée d'un enrichissement sur le gène de la sous-unité ribosomale 16S de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*. 132

Figure 15 : Schéma d'analyses des dilutions d'un site de prélèvement d'eau environnementale pour la quantification par qRT-PCR précédée d'un enrichissement et par la méthode MPN. 137

Figure 16 : Courbes de croissance moyennes d'un *C. jejuni* enrichies pendant 50 h. 141

Figure 17 : Courbe standard externe, créée à l'aide de la souche *C. jejuni* ATCC 33560, pour la quantification par qRT-PCR précédée d'un enrichissement.

148

LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

x g : Force en g

α : Niveau de signification alpha

P : Proportion des échantillons qui donnent un résultat aussi défavorable à l'hypothèse nulle.

ρ : Rho de Spearman

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADN db : ADN double brin

AFLP : « Amplified fragment length polymorphism »

ARNr 16S: Acide ribonucléique de la sous-unité ribosomale 16S

ATCC : « American type culture collection »

BSA : « Bovine serum albumin »

CFU : « Colony forming unit »

CLSI : « Clinical and laboratory standards institute »

Ct : Cycle seuil dans la réaction de PCR en temps réel

DAPI : 4',6' di-amidino-2-phényl indole

dNTP : Combinaison des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)

FISH : « Fluorescence *in situ* hybridization »

FRET : « Fluorescence resonance energy transfer »

GIS : « Geographic information system »

GITC: Guanidine isothiocyanate

ID₅₀ : « Median infectious dose »

LSPQ : Laboratoire de santé publique du Québec

MLST : « Multilocus sequence typing »

MPN : « Most probable number »

MRC : Municipalité régionale de comté

MUG : « Nutrient agar » supplémentée avec du 4 méthylumbelliféryl-glucuronide

NASC : « Nalidixic acid-susceptible campylobacters »

NCBI : « National center for biotechnology information »

NTU : « Nephelometric turbidity unit »

ONPG : Ortho-nitro-phényl-galactopyranoside

pb : Paire de bases

PCR : « Polymerase chain reaction »

PCR 16S : PCR basée sur la détection du gène de la sous-unité ribosomale 16S

PCR 23S : PCR basée sur la détection du gène de la sous-unité ribosomale 23S

PCR hippurate : PCR basée sur la détection du gène *hipO*

PCR-RFLP : PCR combinée à un RFLP

PFGE : « Pulsed-field gel electrophoresis »

qRT-PCR : « Semi-quantitative real-time polymerase chain reaction »

rDNA : « recombinant deoxyribonucleic acid »

RFLP : « Restriction fragment length polymorphism »

rpm : « Revolutions per minute »

RT-PCR : « Real-time polymerase chain reaction »

TSA : « Tryptone Soy agar » supplémentée avec 5% de sang de mouton

TTC : « Thermotolerant coliforms »

U : Unité enzymatique

RÉSUMÉ

Université de Sherbrooke

DÉTECTION, QUANTIFICATION ET IDENTIFICATION DU
CAMPYLOBACTER DANS L'EAU ENVIRONNEMENTALE DE L'ESTRIE

par KAREN ST-PIERRE

Département de microbiologie et infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie

20 Mars 2009

Évaluateurs : Sophie Michaud, département de microbiologie et infectiologie ; Eric

Frost, département de microbiologie et infectiologie ; Louis-Charles Fortier,

département de microbiologie et infectiologie ; Carole Beaulieu, département de

biologie, Université de Sherbrooke

Le Campylobacter est le plus important agent d'entérites bactériennes dans les pays industrialisés et en voie de développement. Des études récentes suggèrent que l'eau non-traitée est une source sous-estimée d'infections sporadiques chez l'humain. Dans le cadre du volet environnemental du projet CampyloGIS, mon projet principal consistait en l'étude de la prévalence et de la quantité du Campylobacter retrouvé dans les eaux environnementales de l'Estrie. Trente-deux sites d'échantillonnage d'eau ont été sélectionnés dans les 7 MRC de l'Estrie pour être échantillonnés

hebdomadairement du 17 juillet 2005 au 08 juillet 2007. Globalement, 1071/2481 (43%), 1481/2471 (60%) et 1463/2471 (59%) échantillons d'eau étaient respectivement positifs pour *Campylobacter* spp., les coliformes thermotolérants et *E. coli*. Il y avait une faible corrélation entre la prévalence hebdomadaire du *Campylobacter* spp. et des coliformes thermotolérants (ρ de Spearman = 0,27 ; $P = 0,008$) et entre la quantité de ces deux microorganismes (τ -b de Kendall = 0,233 ; $P < 0,0001$). Également, plus de 150 échantillons d'eau de puits privés situés en Estrie ont été gracieusement analysés au cours de ce projet. Cinq échantillons d'eau de puits de surface sur 53 étaient positifs pour *C. jejuni* et seulement deux d'entre eux étaient aussi positifs pour les coliformes thermotolérants. Ces résultats suggèrent que les indicateurs de pollution fécale, comme les coliformes thermotolérants, ne sont pas suffisants pour correctement évaluer la présence et/ou la quantité du *Campylobacter* dans l'eau environnementale.

Mon deuxième projet consistait en le développement d'une approche moléculaire d'identification à l'espèce de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* et *C. fetus* basée sur la PCR hippurate, la PCR 16S et la PCR-RFLP. Présentement, l'approche moléculaire permettrait d'éviter la mauvaise identification de 526/1950 isolats (27%) préalablement mal identifiés par les tests biochimiques seuls. Jusqu'à présent, l'approche moléculaire ne permettrait toutefois pas d'identifier correctement à l'espèce 35/1950 isolats (1,8%) de *Campylobacter*. Cette approche moléculaire a permis de confirmer la nécessité d'utiliser plus d'une technique afin de s'assurer de l'identification à l'espèce adéquate du *Campylobacter*.

Finalement, la présence soutenue et la forte concentration occasionnelle du *Campylobacter* détecté dans les eaux environnementales de l'Estrie, ont porté à se questionner sur l'utilité de développer une méthode efficace de détection et de quantification du *Campylobacter* dans l'eau. De cette réflexion et des difficultés d'exécution qu'entraîne l'utilisation de la méthode MPN comme outil quantitatif, est né mon troisième projet, soit un protocole de RT-PCR semi-quantitative précédée d'un enrichissement pour la quantification de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* dans l'eau. Ce projet a permis de constater qu'un enrichissement de 16 h permettait d'augmenter, par un facteur relativement constant, le nombre de *C. jejuni* contenu dans un échantillon d'eau naturellement contaminé et ce, peu importe la condition cellulaire initiale occasionnée par un séjour dans l'eau. De plus, les résultats obtenus via le protocole de RT-PCR semi-quantitative sont comparables à la quantification obtenue via la méthode MPN (ρ de Spearman = 0,84 ; $P < 0,001$), ce qui permet de croire que ce protocole simple pourrait éventuellement être un choix envisageable pour la détection et la quantification du *Campylobacter* dans l'eau.

Mots clés

Campylobacter, eau, identification, PCR, quantification.

INTRODUCTION

Le Campylobacter

Le Campylobacter est une bactérie incurvée en forme de virgule ou de « S », non sporulante, de 0,2 à 0,8 µm de diamètre sur 0,5 à 5,0 µm de longueur, qui est « Gram négative » et qui est mobile grâce à un ou deux flagelle(s) polaire(s) nu(s). Les bactéries du genre Campylobacter sont également dites, fastidieuses, car la presque totalité des 18 espèces répertoriées ont un système respiratoire micro-aérophile, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de croître et de se multiplier seulement à une pression réduite en dioxygène (O₂), soit généralement entre 3 et 15% d'O₂. Aussi, le genre Campylobacter nécessite généralement une température optimale de croissance qui se situe soit à 37°C ou à 42°C, tout dépendamment si l'espèce est thermophile ou non, est incapable de métaboliser les sucres (ni par oxydation, ni par fermentation), la gélatine et l'urée et est positive au test d'oxydase (NACHAMKIN et BLASER, 2000) (MACFADDIN, 2000) (GARRITY *et al.*, 2005). Le genre Campylobacter a été proposé pour la première fois en 1963 par Sebald et Véron pour désigner une bactérie préalablement connue sous le nom de *Vibrio fetus* (NACHAMKIN et BLASER, 2000) (GARRITY *et al.*, 2005). Récemment, une 19^e espèce de Campylobacter, *Campylobacter canadensis*, a été découverte dans la flore fécale de grues blanches d'Amérique (*Grus americana*) maintenues en captivité au zoo de Calgary au Canada (INGLIS *et al.*, 2007).

La campylobactériose humaine

Le *Campylobacter* est le plus important agent d'entérites (diarrhées) bactériennes dans les pays industrialisés et en voie de développement, étant la cause d'environ 5 à 14% de toutes les entérites dans le monde (entérites virales et bactériennes confondues) (EYLES *et al.*, 2003) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Au Canada et au Québec, l'envergure connue de cette infection est telle qu'en 2004, elle était reconnue comme la 4^e maladie à déclaration obligatoire en importance (AGENCE DE SANTÉ PUBLIQUE DU CANADA, 2008). En 1998, il a été estimé que le coût annuel engendré par les cas confirmés d'infection à *Campylobacter* au Canada se chiffrait entre 200 millions et 1,2 milliards de dollars (CONSEIL NATIONAL DE RECHERCHE CANADA, 2008).

Les symptômes d'une infection à *Campylobacter* apparaissent en général de 2 à 3 jours après la contamination, mais l'incubation peut aller de 1 à 7 jours. La campylobactériose humaine est principalement caractérisée par des diarrhées, éventuellement sanglantes dans plusieurs cas, des crampes abdominales, de la fièvre, une perte d'appétit, des nausées et plus rarement des vomissements. Les symptômes peuvent perdurer pendant un minimum de 2 à 5 jours avant, de façon générale, de se résorber par eux-mêmes. Des complications post-infectieuses au *Campylobacter* ont déjà été observées comme l'arthrite réactive, l'urticaire et l'érythème noueux. La plus importante complication post-infectieuse au *Campylobacter* connue est le syndrome de Guillain-Barré, qui est une neuropathie auto-immune inflammatoire du système nerveux périphérique. Ce syndrome, qui survient dans 1 cas d'infection par le *Campylobacter jejuni* sur 1000, entraîne une paralysie ascendante qui peut, dans

certain cas, demeurer permanente. (KOENRAAD *et al.*, 1997) (MOORE *et al.*, 2005) (GALANIS, 2007) (HUMPHREY *et al.*, 2007)

Malgré l'importance de la campylobactériose humaine au niveau de la santé publique, la pathogénèse de la maladie est encore méconnue. En effet, l'identification des facteurs impliqués dans l'invasion et la thermotolérance, le rôle de l'inflammation et de gènes spécifiques dans la virulence, ainsi que la production de toxines par *C. jejuni* sont des exemples de mécanismes pathogéniques qui restent encore à être éclaircis et ce, autant pour *C. jejuni* que pour les autres espèces de *Campylobacter*. Cependant, quelques importants facteurs de virulence ont déjà été identifiés chez *C. jejuni*, comme le flagelle, qui est un élément capital permettant des événements cruciaux pour l'infection chez l'humain comme la chimiotaxie, la mobilité, l'adhésion et l'invasion des cellules épithéliales intestinales (VAN VLIET et KETLEY, 2001) (POLY et GUERRY, 2008). D'autres adhésines, comme les protéines PEB1 et CadF, joueraient également un rôle dans l'adhésion et l'invasion de *C. jejuni* (KONKEL *et al.*, 1997) (PEI *et al.*, 1998). Aussi, malgré le fait que quelques groupes de recherche ont rapporté la présence d'autres toxines, seul le gène *cdt* codant pour la toxine de dilatation cytotytique a été isolé chez *C. jejuni*. Des mécanismes de glycolysation et de résistance aux stress (superoxyde dismutase, catalase et alkyle hydroperoxyde réductase) ont également été identifiés chez *C. jejuni*. Un consensus affirme que pour améliorer les connaissances sur la pathogénèse du *Campylobacter*, il faudra, entre autres, un modèle animal fiable et reproductible capable de développer des symptômes analogues à ceux rencontrés chez des patients atteints de la campylobactériose humaine (VAN VLIET et KETLEY, 2001) (BOLLA et GARNOTEL, 2008) (POLY et GUERRY, 2008).

Les facteurs de risques

Au Canada, entre autres, la majorité des cas humains de campylobactériose est sporadique et de source imprécise (THOMAS *et al.*, 2006). De plus, dans les régions tempérées, la majorité des infections à *Campylobacter* est principalement répertoriée au cours des mois d'été (ALTEKRUSE *et al.*, 1999) (THOMAS *et al.*, 1999) (NYLEN *et al.*, 2002) (MICHAUD *et al.*, 2004) (HUMPHREY *et al.*, 2007) et les groupes d'âges les plus à risque sont les enfants de moins de 5 ans et les jeunes adultes (MICHAUD *et al.*, 2004) (AGENCE DE SANTÉ PUBLIQUE DU CANADA, 2008) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). La notion générale, dans la littérature, soutient que c'est la consommation et/ou la manipulation inadéquate de poulet cru ou insuffisamment cuit qui est la principale source d'infection sporadique de l'humain par le *Campylobacter* (KOENRAAD *et al.*, 1997) (MOORE *et al.*, 2005) et 80 à 90% des infections sont dues à *C. jejuni*, principale espèce de *Campylobacter* retrouvée chez la volaille (NACHAMKIN et BLASER, 2000) (STEINHAUSEROVÁ *et al.*, 2001) (MURRAY *et al.*, 2003). Il existe toutefois d'autres sources importantes de contamination, notamment via le contact avec des animaux domestiques (chatons et chiots plus particulièrement) ou de ferme, la consommation de lait cru et/ou de produits à base de lait cru et la consommation d'eau non traitée ou incorrectement traitée (KOENRAAD *et al.*, 1997).

L'eau comme facteur de risque

L'importance réelle de l'eau comme source de cas sporadiques de campylobactériose chez l'humain est de plus en plus considérée, mais est encore méconnue. Cependant, l'importance de l'eau comme source épidémique de

campylobactérioses humaines est bien documentée. Un exemple canadien pour illustrer ce lien est l'épidémie survenue dans la ville de Walkerton, Ontario en 2000 (CLARK *et al.*, 2003). C'est plus de 2300 personnes qui ont été majoritairement infectées par le *Campylobacter*, mais également par *Escherichia coli* O157:H7, à cause d'un puits principal d'approvisionnement en eau potable de la ville qui avait été mal inspecté et qui avait été contaminé par des fèces de bovins lessivées par une pluie abondante. Également, une étude rétrospective a révélé que 16% (24/150) des épidémies en lien avec l'eau de consommation répertoriées entre 1974 et 2001 au Canada avaient impliqué le *Campylobacter* (SCHUSTER *et al.*, 2005). De ces faits, il est important de savoir que la consommation d'eau contenant même une faible quantité de *Campylobacter* peut être un facteur de risque pour la santé humaine (TEUNIS *et al.*, 2005). En fait, des études réalisées sur des volontaires ont démontré que le *Campylobacter* affichait une courbe dose-réponse classique de forme sigmoïde avec une faible dose infectieuse entre 500 et 800 bactéries pour avoir 50% de chances (ID_{50}) de contracter l'infection (BLACK *et al.*, 1988) (BLACK *et al.*, 1992) (ROBINSON, 1981). Aussi, la probabilité de contracter la campylobactériose humaine après l'ingestion d'une seule et unique bactérie est estimée à environ 1 chance sur 150 (ROSE et GERBA, 1991).

Les outils de prévention utilisés

Aucun protocole de détection et de quantification du *Campylobacter* dans l'eau n'a été standardisé et n'est donc utilisé pour vérifier la qualité de l'eau de consommation et de l'eau à des fins récréatives. En fait, les laboratoires accrédités d'analyses d'eau se basent principalement sur la présence ou non des coliformes thermotolérants (coliformes fécaux), notamment *Escherichia coli*, pour suspecter ou

non la présence du *Campylobacter* dans l'eau. L'intérêt de la détection de ces coliformes thermotolérants comme organismes indicateurs, réside dans le fait qu'ils font partie intégrante de la microflore intestinale normale de plusieurs animaux à sang chaud, que leur survie dans l'environnement est généralement équivalente à celle d'autres bactéries pathogènes pour l'humain et que leur densité est généralement proportionnelle au degré de pollution produite par les matières fécales (CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, 2005) (GROUPE SCIENTIFIQUE SUR L'EAU, 2003). La validité de cette méthode d'évaluation du degré de pollution fécale, utilisée depuis plus d'une centaine d'années, est cependant remise en question. En fait, des études, effectuées dans plusieurs pays, n'ont pas démontré d'association entre la présence du *Campylobacter* et la présence des coliformes thermotolérants dans l'eau (CARTER *et al.*, 1987) (HOLLER, 1988) (KOENRAAD *et al.*, 1997) (SAVILL *et al.*, 2001). De plus, la menace du *Campylobacter* dans l'eau est bien réelle (JONES, 2001) (CLARK *et al.* 2003) (HORMAN *et al.* 2004) (SCHUSTER *et al.*, 2005) (ABULEREESH *et al.*, 2006) (TILL *et al.*, 2008). En fait, le *Campylobacter* fait partie intégrante de la microflore naturelle du tractus gastro-intestinal de plusieurs mammifères et oiseaux autant domestiques (ex. : chats, chiens, hamsters syriens, etc.), d'élevage (ex. : bovins, ovins, porcins, caprins, etc.), que sauvages (goélands, canards, rongeurs, pigeons, etc.) (NACHAMKIN *et al.*, 1992) (NACHAMKIN et BLASER, 2000). Cette grande présence du *Campylobacter* au sein de cette multitude d'espèces animales permet ainsi de faciliter la dissémination de la bactérie un peu partout dans l'environnement, notamment dans l'eau, via les fèces de ces animaux. Par conséquent, il apparaît nécessaire de réévaluer les critères et protocoles pour la surveillance de la qualité de l'eau de consommation et de l'eau à des fins récréatives.

Le projet

De tous ces faits et connaissances, et entre autres des travaux de MICHAUD *et al.*, 2004, est né le projet CampyloGIS. Ce projet a pour but d'identifier les principaux mécanismes et sources de transmission du *Campylobacter* entre les animaux, l'environnement, les aliments et l'humain en Estrie, afin de mieux comprendre le risque infectieux et de proposer l'implantation de mesures efficaces de prévention et de contrôle. Pour ce faire, le projet vise à utiliser une approche de typage moléculaire par « Multilocus sequence typing » (MLST) et un système d'information géographique (GIS). Le GIS rassemblerait des données environnementales et sanitaires pour évaluer le risque de contamination de l'humain par le *Campylobacter* selon la qualité de l'eau et l'utilisation des sols, par exemple. Le MLST, quant à lui, est la méthode de référence pour l'analyse des populations génétiques du *Campylobacter* (MAIDEN *et al.*, 1998) et cette méthode est la seule qui a permis de relier certains clones de *Campylobacter* à des niches écologiques spécifiques (DINGLE *et al.*, 2001a) (DINGLE *et al.*, 2001b) (DINGLE *et al.*, 2001c). Le MLST permettrait donc de valider les liens épidémiologiques identifiés par le GIS, afin d'identifier de nouvelles relations causales entre une source potentielle de *Campylobacter* et un cas humain, par exemple. Ainsi, avec ces outils, il sera entre autres possible de vérifier certaines hypothèses comme, par exemple, si les sources de contamination de l'humain par le *Campylobacter* en milieu urbain diffèrent de celles en milieu semi-rural ou rural et si, en milieu semi-rural ou rural, l'eau de surface serait en majeure partie contaminée par des fèces de ruminants. Le projet CampyloGIS s'est déroulé entièrement dans la région de l'Estrie qui comprend 7 municipalités régionales de comté (MRC) (Asbestos, Coaticook, Granit, Haut St-François, Memphrémagog,

Sherbrooke et Val St-François). En 2000, il a été estimé que 59,3% de la population totale de l'Estrée utilisait, comme source d'eau de consommation, de l'eau de surface, notamment de l'eau provenant de rivières ou de lacs (DÉVELOPPEMENT DURABLE, ENVIRONNEMENT ET PARCS QUÉBEC, 2008).

Dans le cadre du volet « environnement » du projet CampyloGIS, mon rôle, en tant qu'étudiante à la maîtrise, a été de déterminer, dans un premier temps, qu'elles étaient la prévalence et la quantité hebdomadaire du *Campylobacter* dans les rivières et les ruisseaux de l'Estrée durant la période du 17 juillet 2005 au 08 juillet 2007 (104 semaines). Avec ces données, je devais déterminer si la prévalence et la quantité du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrée variaient dans le temps (années, saisons, semaines, etc.) et selon certaines variables physico-chimiques (température et turbidité) et s'il existait une association entre la présence et/ou la quantité du *Campylobacter* et la présence et/ou la quantité des coliformes thermotolérants et d'*E. coli*. Cette partie de mon travail, qui correspond à environ 60% de ma maîtrise, est présentée sous forme d'article scientifique ayant comme titre : « Thermotolerant coliforms are not a good surrogate for *Campylobacter* in environmental water ». Dans un deuxième temps, je devais développer une approche moléculaire d'identification pour 5 espèces de *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* et *C. fetus*), afin de pouvoir, entre autres, valider l'identification à l'espèce des isolats de *Campylobacter* récoltés lors de l'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrée. Cette deuxième partie de mon travail, qui correspond à environ 25% de ma maîtrise, est présentée à la suite de mon article scientifique sous le titre : Approche moléculaire pour l'identification de 5 espèces de *Campylobacter* par PCR hippurate, PCR 16S et

PCR-RFLP. Finalement, le troisième et dernier objectif de ma maîtrise consistait en le développement d'une réaction de polymérase en chaîne (PCR) semi-quantitative en temps réel pour 3 espèces thermophiles de *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*) qui ont notamment été observées dans l'eau. Cette partie de mon travail visait le développement d'une méthode de détection et de quantification du *Campylobacter* dans l'eau plus simple et plus rapide que la méthode du « Most probable number » (MPN) utilisée dans l'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrie et qui pourrait plus aisément être standardisée. Cette dernière partie de mon travail, qui correspond à environ 15% de maîtrise, est présentée sous le titre : Développement d'une PCR en temps réel semi-quantitative pour *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* et *Campylobacter lari* dans l'eau.

CHAPITRE 1

AVANT-PROPOS DE L'ARTICLE

Titre

« Thermotolerant coliforms are not a good surrogate for *Campylobacter* in environmental water »

Auteurs

Karen St-Pierre, Simon Lévesque, Eric Frost, Nathalie Carrier, Robert D. Arbeit et Sophie Michaud.

État de l'article à ce jour

Soumis pour publication à la revue « Applied and Environmental Microbiology » le 26 Février 2009.

Le formulaire « Autorisation d'intégration d'un article écrit en collaboration à un mémoire ou une thèse » a été signé par chaque co-auteure ou co-auteur conformément à la « Directive relative au dépôt des essais, des mémoires et des thèses » de l'Université de Sherbrooke.

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

Cette étude avait pour but de déterminer l'importance de faire la détection et la quantification du *Campylobacter* dans l'eau environnementale à des fins préventives. La prévalence et la quantité du *Campylobacter*, des coliformes thermotolérants et du *E. coli* ont été déterminées via l'analyse de 2481 échantillons d'eau environnementale pour le *Campylobacter* et de 2471 échantillons d'eau environnementale pour les deux autres microorganismes. Les échantillons d'eau ont été prélevés hebdomadairement, du 17 juillet 2005 au 08 juillet 2007, dans 13 rivières et 12 ruisseaux tous situés en Estrie, Québec, Canada. Globalement, 1071/2481 (43%), 1481/2471 (60%) et 1463/2471 (59%) échantillons d'eau étaient respectivement positifs pour le *Campylobacter*, les coliformes thermotolérants et *E. coli*. Une faible corrélation entre la distribution hebdomadaire du *Campylobacter* et des coliformes thermotolérants ($\text{Rho de Spearman} = 0,27$; $P = 0,008$) et entre la quantité de ces deux microorganismes ($\text{Tau-b de Kendall} = 0,233$; $P < 0,0001$) a été observée. Aussi, plus de 150 échantillons d'eau de puits privés (artésien et de surface) situés en Estrie ont été gracieusement analysés au cours de ce projet. Cinq (10%) échantillons d'eau de puits de surface sur 53 étaient positifs pour *C. jejuni* et seulement deux d'entre eux étaient aussi positifs pour les coliformes thermotolérants. Ces résultats suggèrent que les indicateurs de pollution fécale, comme les coliformes thermotolérants, ne sont pas suffisant pour correctement évaluer la présence et/ou la quantité du *Campylobacter* dans l'eau environnementale. L'investigation du rôle de l'eau environnementale

comme source sporadique d'infection à *Campylobacter* nécessitera l'utilisation de techniques de surveillance plus spécifiques.

Contribution de l'étudiante

J'ai contribué activement et pleinement à l'élaboration et à l'obtention de tous les résultats décrits dans l'article. J'ai également écrit entièrement la première ébauche du manuscrit.

THERMOTOLERANT COLIFORMS ARE NOT A GOOD SURROGATE FOR *CAMPYLOBACTER* IN ENVIRONMENTAL WATER

Karen St-Pierre¹, Simon Lévesque¹, Eric Frost¹, Nathalie Carrier² Robert D. Arbeit³,
Sophie Michaud¹.

1. Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

2. Centre de Recherche Clinique Étienne Le-Bel du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

3. Infectious Diseases Section, Tufts University School of Medicine, Boston, MA, USA.

Corresponding author

Sophie Michaud, M.D., M.P.H., C.S.P.Q., F.R.C.P.C.

Department of Microbiology and Infectious Diseases

Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke

3001, 12e avenue Nord

Sherbrooke, Québec J1H 5N4

Phone: (819) 564-5321, Fax: (819) 564-5392

E-mail: Sophie.Michaud@USherbrooke.ca

Financial support

The Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Centre de Recherche Clinique Étienne Le-Bel.

Running head

Campylobacter in environmental water.

Key words

Campylobacter, thermotolerant coliforms, *Escherichia coli*, environmental water, detection, quantification, MPN.

Word count (text)

4,829 words.

Abstract

This study aimed to assess the importance of quantitatively detecting *Campylobacter* in environmental surface water. The prevalence and the quantity of *Campylobacter*, thermotolerant coliforms and *E. coli* were determined in 2,471 samples collected weekly, over a two-year period, from 13 rivers and 12 streams in the Eastern Townships, Québec, Canada. Overall, 1,071 (43%), 1,481 (60%) and 1,463 (59%) samples were positive for *Campylobacter* spp., thermotolerant coliforms, and *E. coli* respectively. There were weak correlations between the weekly distributions of *Campylobacter* spp. and thermotolerant coliforms (Spearman's rho coefficient = 0.27; $P = 0.008$), and between the quantitative levels of the two classes of organisms

(Kendall tau-b correlation coefficient = 0.233; $P < 0.0001$). A convenience sample of well water in the Eastern Townships was also tested. Five (10%) of 53 samples from private surface wells were positive for *C. jejuni*, of which only two were positive for thermotolerant coliforms. These findings suggest that microbial monitoring of raw water by using only fecal indicator organisms is not sufficient for assessing the occurrence or the load of thermophilic *Campylobacter*. Insights into the role of environmental water as a source for sporadic *Campylobacter* infection will require genus-specific monitoring techniques.

Word count

195 words.

Introduction

Campylobacter jejuni is the leading reported cause of bacterial gastroenteritis in developed countries (2). In 2002 in Canada, it was the leading notifiable enteric food- and waterborne disease, with 11,543 reported cases (<http://dsol-smed.phac-aspc.gc.ca>). In Quebec province alone, nearly 3,000 cases of diarrheal illness are attributed annually to *Campylobacter* enteritis, more than the combined total caused by *Salmonella* and *Shigella* species, *E. coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* (15). THOMAS *et al.*, 2006 recently concluded that even these numbers appear to represent a substantial underestimate of the public health burden of this enteric pathogen and that for every case of *Campylobacter* infection reported in Canada each year, there are an additional 23 to 49 cases (50).

The epidemiology of campylobacteriosis is poorly understood (18, 20). Raw milk, untreated surface water, and poultry have all been well-documented as sources of *Campylobacter* outbreaks (1, 8, 25, 26, 35, 39, 41, 44, 46, 52). Nevertheless, most clinical cases appear as isolated, sporadic infections for which the source is rarely identified (6). Identifying the sources and routes of transmission of campylobacteriosis is essential for developing effective, targeted preventive measures.

There is ample opportunity for *Campylobacter* to contaminate environmental water, including streams, rivers, and lakes. The genus colonizes a wide variety of hosts, from domestic animals to wild birds, and thus an extensive burden of organisms is excreted via animal fecal material (2, 8). Other potential sources include discharge from wastewater treatment plants.

Testing for indicator organisms (typically thermotolerant coliforms or *E. coli*) has generally been considered to reflect adequately the presence of enteric pathogens; consequently, Campylobacters have not been explicitly monitored in water. However, several recent reports suggest a poor correlation between the levels of *Campylobacter* and marker organisms in water supplies (23). The overall objective of the CampyloGIS project is to identify the main sources of *Campylobacter* infections and the mechanisms of transmission between animals, the environment, food and humans. We present here the first component of the project, focusing on the relationship between the presence and the quantity of *Campylobacter* spp. compared with that of thermotolerant coliforms and *E. coli* in environmental and well waters.

Materials and methods

Environmental water sampling sites and sampling. The Eastern Townships comprise 88 municipalities, with an area totaling 10,187 km² and a population of about 300,000 inhabitants. About half of the population lives in Sherbrooke, a small metropolitan area, with the remaining municipalities being either rural or semi-rural. Thirty-two sampling sites located on 13 rivers and 12 streams were selected among the 7 counties of the Eastern Townships (Figure 1), and sampled weekly from July 17, 2005 to July 08, 2007, except during holidays and during winter if sites were frozen.

The sampling sites were selected to include the most important rivers and streams representing various contamination sources and catchment areas in the Eastern Townships. Primary selection was made on a macro level by using map reconnaissance and on a micro level by evaluating the accessibility of the sites, and their proximity with cattle farms or gathering points for wild birds and animals. Exact sampling points were recorded by using a global positioning system satellite device (Garmin).

For each sampling site, ~ 3,000 ml of water were collected weekly from the nearshore areas or from a bridge passing over the site, using a horizontal alpha water sampler (Geneq) at a depth about 15 to 30 cm below the surface. The sample was divided into one 2,000-ml and two 500-ml sterile Nalgene bottles, transported on ice to the laboratory, held at 4°C and tested within 24 h.

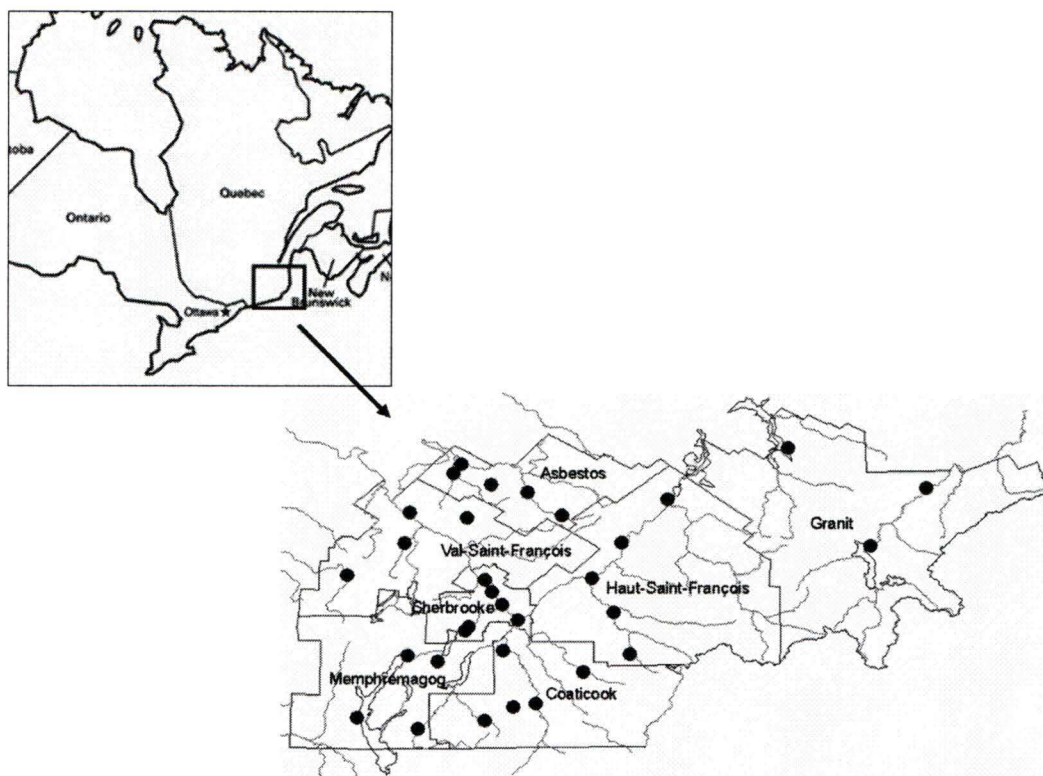


FIGURE 1. Geographic locations of the 32 sampling sites among the 7 counties of the Eastern Townships, Québec, Canada.

Physicochemical analyses. The temperature (°C) and the turbidity (NTU) were assessed with a portable multiparametric probe U-10 device (Horiba) while sampling at the sampling site.

Thermotolerant coliforms and *E. coli* analyses. For each sampling site, 100 ml of water were filtered using a sterile 0.45 µm membrane. The membrane was transferred onto a m-Fc agar plate (BD Diagnostics) and incubated at 44.5°C for 24 h. Then, colonies of each color were enumerated - blue colonies being counted as thermotolerant coliforms - , and one colony of each color on m-FC agar was subcultured on MacConkey agar (Oxoid) and incubated aerobically at 37°C for 24 h. Each lactose-positive isolate was plated on Tryptone Soy agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood (TSA) (Oxoid) and incubated aerobically at 37°C for 24 h. Isolates giving positive results for catalase, indole spot, MUG and ONPG hydrolysis tests and a negative result for the oxydase test, were counted as presumptive *E. coli* (13).

Analyses of *Campylobacter* spp. For each sampling site, 5 volumes of water (1 x 2,000 ml, 1 x 500 ml and 3 x 10 ml) were analysed and quantified using the Most Probable Number (MPN) method (10, 21, 40). The 1 x 2,000 ml and 1 x 500 ml water volumes were filtered through a sterile 0.45 µm membrane (Millipore Corporation) (CORRY *et al.*, 1995). If needed, turbid samples were initially filtered with a sterile 1.5 µm membrane (VWR International) and this membrane was incubated with the corresponding 0.45 µm membrane filter in 25 ml of Preston broth (Oxoid). The 3 x 10 ml water volumes were incubated without filtration in 15 ml on Preston broth 1.5X. All broths were incubated at 37°C for 3 h, and then at 42°C for an additional 45 h in a

microaerobic atmosphere. Next, 200 µl of the suspension were plated on Karmali agar (Oxoid) and incubated at 42°C for 48 h under microaerobic conditions. In parallel, 1 ml of suspension was transferred to a 1.5 ml microcentrifuge tube and used to detect the presence of thermophilic *Campylobacter* by PCR (see DNA extraction). After 48 h, Karmali plates were examined and suspect colonies (round light grey colonies with/without spreading) were subcultured on TSA and incubated at 42°C for 24 h in a microaerobic atmosphere (29).

Presumptive *Campylobacter* spp. colonies were confirmed microscopically and each plate was given a positive or negative score. Due to the intense workload associated with testing 5 volumes of water for each site, only one presumptive *Campylobacter* spp. isolate per site was identified to the species-level by routine phenotypic methods (oxydase, catalase, indoxyl acetate, sodium hippurate hydrolysis in test tube, and susceptibility to nalidixic acid and cephalotin) (33) and by the molecular approaches described below. Bacterial isolates were stored at -80°C for further analyses. If the isolate was confirmed as *Campylobacter* spp., it was assumed that the other presumptive *Campylobacter* spp. isolates originating from the same site sample were also *Campylobacter* spp. If not, the site sample was excluded from the study because it was impossible to formally prove that the sample contained *Campylobacter* spp.

Control strains. *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, *Campylobacter coli* ATCC 49941, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 were used as control strains.

DNA extraction. Crude DNA was extracted by adding 25 µl of NaOH 0.5 N to the pellet of a 1-ml suspension of Preston broth centrifuged at 13,000 rpm (~ 15,860 x g) for 10 min, or one single colony of a presumptive *Campylobacter* spp. isolate. After 5 minutes at room temperature, 25 µl of Tris 1M pH 8.0 and 450 µl (for extracts from a single colony) or 100 µl (for extracts from the pellet of enrichment broth) of sterile distilled water were added. DNA extracts were stored at -20°C. DNA was also extracted with the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) from isolates giving negative results with *hipO* gene PCR (see below), to make sure that these negative results were not due to an extraction problem.

16S rDNA PCR. DNA extracts of the Preston broth suspensions and of presumptive *Campylobacter* spp. isolates were tested for the presence of *C. jejuni*, *C. coli* or *C. lari* using the primers and PCR conditions described by LUBECK *et al.*, 2003 (30), except that 1 µl (100 copies) of a 420 bp positive internal control (made in an analogous fashion to that described by FROST *et al.*, 1995 (19)) was added to each PCR reaction mix (29).

Identification of *C. jejuni* using *hipO* gene PCR. DNA extracts of all presumptive *Campylobacter* spp. isolates were tested for the presence of the *hipO* gene using the primers and PCR conditions described by SLATER et OWEN, 1997 (43). Isolates in which the hippuricase gene could be detected by polymerase chain reaction were identified as *C. jejuni*.

Well water sampling. During the study, we offered to test without charge the surface and/or groundwater well water of patients having been diagnosed with a

Campylobacter spp. infection, of cattle breeding farms and farmers' homes (from farms participating in another component of the CampyloGIS project) and of citizens presenting to Laboratoires d'analyses S. M. inc. Wells had to be located in the Eastern Townships and could be sampled only once during the study. One 2,000-ml sterile Nalgene bottle containing 20 ml of 1% sterile sodium thiosulphate (Sigma-Aldrich) to neutralize chlorine was aseptically filled with well water, transported on ice to the laboratory, held at 4°C and tested within 24 h. The 2,000-ml sample was used for *Campylobacter* spp. and thermotolerant coliforms detection using the methods previously described. The MPN *Campylobacter* spp. quantification method was not applied to well samples, but thermotolerant coliforms were enumerated.

Statistical analyses. Most Probable Numbers (MPN) of organisms based on the culture results were generously calculated by Juan M. Gonzalez (21). Prevalence rates of *Campylobacter* spp, thermotolerant coliforms and *E. coli* were calculated for each microbe analyzed, and the annual mean of the weekly rates compared by year using the Chi-square two-tailed test. A Phi correlation coefficient with a two-tailed *P* value was calculated for cross-correlations between the presence of *Campylobacter* spp. and the presence of thermotolerant coliforms or *E. coli* (27). Since the same 32 sampling sites were tested each week and that the final number of samples per sampling site was variable, compliance with the independence assumption was uncertain. Therefore, a Phi correlation coefficient was calculated for each of the 32 sampling sites and an average of these 32 values was calculated to obtain a mean global Phi coefficient value.

The Chi square two-tailed test was used to compare the distributions of *Campylobacter* and of thermotolerant coliforms per season for each year. The Kendall tau-c statistic was used to examine the relationship between the presence of *Campylobacter* and the categorical levels of thermotolerant coliforms as defined by the Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec (<http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/recreative/qualite.htm>). Their criteria for the microbiological evaluation of thermotolerant coliforms in recreational waters specify four levels of water quality – excellent, good, mediocre and poor – corresponding to 0-20, 21-100, 101-200 and > 200 CFU/100 ml; bathing and other direct contacts are forbidden with poor quality water. The Kendall tau-b statistic was used to examine the relationship between the levels of thermotolerant coliforms and those of *Campylobacter*, categorized as < 0.4, 0.4-4.0, 4.0-40.0 and > 40.0 MPN/L.

Arithmetic means and standard deviations were calculated for water temperature and turbidity. In addition, the Chi-square two-tailed test was used to assess relationship between the proportion of positive samples for *Campylobacter* spp., thermotolerant coliforms and *E. coli* with water temperature (in intervals of 5°C) and with turbidity (in intervals of 25 NTU). The sensitivity and specificity of the 16S PCR were calculated globally, as well as for the three volumes (2,000 ml, 500 ml and 10 ml) of water taken separately, using the culture results for *Campylobacter* spp. as reference; all *Campylobacter* spp. isolates were included in these analyses, even if isolates could not be identified to the species level using the methods described above. The culture and 16S PCR results were also compared using the kappa statistic and McNemar's test. Data were analyzed with Statistix for Windows version 7.1

(Analytical Software, Tallahassee, Fl.), SPSS 14.0 or StatXact 6.2 (Cytel Software Corporation), using a significance level of 5%.

Results

Environmental water analyses. From July 17, 2005 to July 08, 2007, 2,488 site samples were tested for *Campylobacter* spp., thermotolerant coliforms and *E. coli*. The total number of water samples tested per site varied from 62 to 93 (median = 78) as some sites (especially the smaller streams) were frozen more often than others. No sampling was done during 7 weeks (December 18, 2005 to January 08, 2006, October 29, 2006 to November 04, 2006 and December 17, 2006 to January 07, 2007), due to Christmas holidays and a scientific meeting. Seven site samples were excluded from the *Campylobacter* spp. analyses, either because it was not possible to formally prove that the samples contained *Campylobacter* spp., or due to technical errors. Ten additional site samples could not be analyzed for thermotolerant coliforms and *E. coli* due to technical errors. Therefore, 2,481 site samples were used for the analyses specifically related to *Campylobacter* spp., and 2,471 site samples were included in the analyses comparing *Campylobacter* spp. to thermotolerant coliforms and *E. coli*.

Overall, 1,071 (43%), 1,481 (60%) and 1,463 (59%) samples were found to be positive for *Campylobacter* spp., thermotolerant coliforms, and *E. coli* respectively. The presence of *E. coli* and thermotolerant coliforms were highly correlated with an agreement rate of 89.9% and a Phi coefficient of 0.79 ($P < 0.0001$). Only 106 (4.7%) of the 2,471 samples were negative for thermotolerant coliforms but positive for *E. coli*; consequently, the comparative analyses emphasize the associations for *Campylobacter* and thermotolerant coliforms.

Among the *Campylobacter* spp.-positive samples, 874 (82%) were identified as *C. jejuni*, 11 (1%) as *C. coli*, 58 (5%) as *C. lari*, and 128 (12%) isolates could not be identified to the species level using the methods described above; 29 of these isolates died before the DNA extraction was performed. Of note, 178 (21%) of the isolates identified as *C. jejuni* by *hipO* gene PCR had a negative hippurate result when tested biochemically, and 73 (8%) gave a *hipO* gene PCR positive result only after DNA was extracted using the DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen).

The agreement between culture and 16S rDNA PCR for detecting *Campylobacter* spp. was very good (kappa statistic = 0.88; $P = 0.31$ as determined by McNemar's test). The global sensitivity and specificity of the 16S PCR compared to culture were 89% and 98%, respectively (Table 1). The sensitivity of the 16S rDNA detection PCR is defined as the ability of the PCR method to detect the 16S rDNA gene of *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* when *C. jejuni*, *C. coli* or *C. lari* was detected by the culture method, i.e. $[(\text{PCR} +, \text{culture} +) \div \text{culture} +]$. Example for the 2,000-ml : $940 \div (940 + 72) \times 100 = 93\%$. The specificity of the 16S rDNA detection PCR is defined as the ability of the PCR method to not detect the 16S rDNA gene of *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* when *C. jejuni*, *C. coli* or *C. lari* was not detected by the culture method, i.e. $[(\text{PCR} -, \text{culture} -) \div \text{culture} -]$. Example for the 2,000-ml : $1393 \div (1393 + 76) \times 100 = 95\%$. The highest sensitivity for the 16S PCR (93%) was observed for the 2,000-ml volume, followed by the 500-ml (89%) and the 10-ml (76%) volumes. The proportion of culture-negative, 16S PCR-positive results was also higher among the 2,000-ml samples (5%), compared to the 500-ml and 10-ml samples (1%).

TABLE 1. Comparison of culture and 16S rDNA PCR for detecting *Campylobacter* spp. in 2,000-ml, 500-ml and 10-ml water samples.

Water samples	Culture + PCR +	Culture + PCR -	Culture - PCR +	Culture - PCR -	Total	Sensitivity (%)	Specificity (%)
2000 ml ^a	940	72	76	1393	2481	93	95
500 ml ^b	439	56	29	1957	2481	89	99
10 ml ^c	177	56	60	7150	7443 ^d	76	99
All ^e	1556	184	165	10500	12405	89	98

^aKappa statistic= 0.88; p= 0.74, as determined by McNemar's test.

^bKappa statistic = 0.89; p= 0.34, as determined by McNemar's test.

^cKappa statistic = 0.75; p= 0.71, as determined by McNemar's test.

^dThree 10-ml subsamples of water were analyzed per site sample.

^eAll subsamples combined: kappa statistic = 0.88; p= 0.31, as determined by McNemar's test.

Table 2 shows the frequency of the observed combinations of positive water volumes among the 2,481 environmental water site samples tested for *Campylobacter* spp., and the MPN calculated using the 1 x 2,000 ml, 1 x 500 ml and 3 x 10 ml setup. The estimated quantity of *Campylobacter* spp. was between 0.4 to < 4.0 MPN/L in 25%, between 4.0 to < 40.0 MPN/L in 13%, and ≥ 40.0 MPN/L in 5% of site samples, respectively; 57% of site samples were negative for *Campylobacter* spp. (< 0.4 MPN/L).

The presence of *Campylobacter* spp. and thermotolerant coliforms were poorly correlated among 2,471 environmental water site samples. Of the 990 samples negative for thermotolerant coliforms 331 (33%) contained *Campylobacter* spp. Conversely, among the 1,481 samples positive for thermotolerant coliforms, 747 (50%) were negative for *Campylobacter* spp. The global analysis of the association between the presence of *Campylobacter* spp. and the presence of thermotolerant coliforms showed a Phi coefficient of 0.16 ($P < 0.0001$), consistent with a very weak association. When analyzing the data for each sampling site separately, the Phi coefficients varied between -0.30 and 0.49, with a mean \pm standard deviation of 0.10 ± 0.11 . The results were similar when analyzing the results for each year separately (data not shown).

TABLE 2. Observed frequency of combinations of positive water subsamples among the 2,481 water samples tested for *Campylobacter* spp. and the mean and 95% confidence limits of MPN/L calculated using the 1 x 2,000 ml, 1 x 500 ml and 3 x 10 ml volumes.

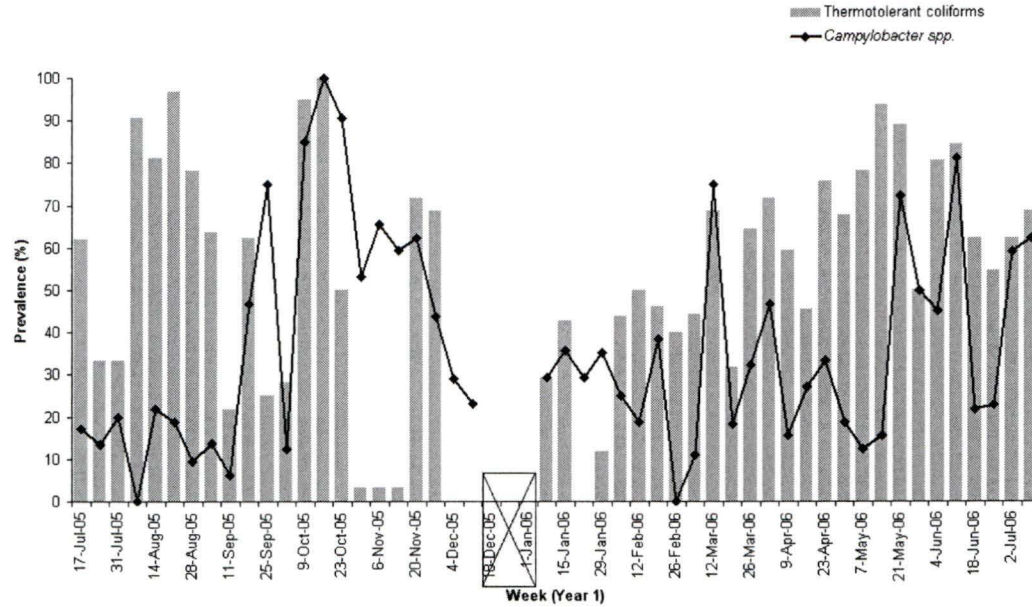
Combination of positives	Frequency (%)	MPN/L	95%CI LL ^a	95%CI UL ^b
0-0-0	1,410 (56.8%)	< 0.4	–	–
1-0-0	550 (22.2%)	0.78	0.14	4.38
1-1-0	329 (13.3%)	5.75	0.13	259.16
1-1-1	64 (2.6%)	40.61	0	Infinity
0-1-0	45 (1.8%)	0.44	0.05	3.55
1-1-2	32 (1.3%)	110.02	0	Infinity
1-1-3	17 (0.7%)	604.52	0	Infinity
1-0-[any positive]	20 (0.8%)	2.04 – 5.83	0.12	291.70
0-1-[any positive]	8 (0.3%)	0.89 – 1.80	0.17	8.43
0-0-[any positive]	6 (0.2%)	0.4 – 1.19	0.05	5.75

95% lower^a and upper^b confidence limits of the MPN/L values.

Figure 2 shows the prevalence rates of *Campylobacter* spp. and of thermotolerant coliforms in environmental water by week throughout the two years of the study. *Campylobacter* spp. was recovered in environmental water all year long, but the prevalence rates per week, and even from one year to the other, were quite variable: 37% of samples were positive for *Campylobacter* spp. during the first year of the study, compared to 49% during the second year ($P < 0.0001$). Similar variability was observed for thermotolerant coliforms, with 54% positive samples during the first year, compared to 66% during the second year ($P < 0.0001$).

However, there was only a weak correlation between the presence of *Campylobacter* spp. and thermotolerant coliforms by week of collection (Spearman's rho coefficient = 0.27, $P = 0.008$). For example, in July-August 2005 as well as in April-May 2006, the prevalence rates of thermotolerant coliforms were high, compared to low rates of *Campylobacter* spp. In contrast, from the end of October to mid-November 2005, rates of *Campylobacter* spp. were quite high, whereas rates of thermotolerant coliforms in water were very low. There were some weeks, such as in October 2005, where both classes of organisms were present at high levels; we speculate that these were periods of manure spreading associated with heavy rains, but this remains to be confirmed.

A



B

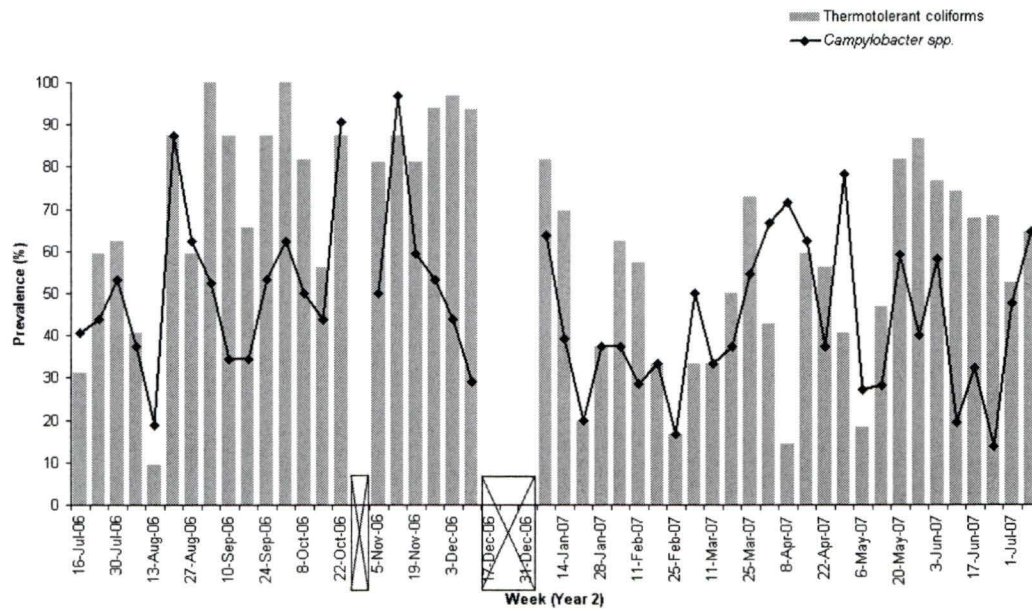


FIGURE 2. Prevalence of *Campylobacter* spp. and thermotolerant coliforms per week, (A) for the first year of the study (July 17, 2005 to July 09, 2006) and (B) for the second year (July 16, 2006 to July 08, 2007). The 7 weeks during which no sampling was done are represented by the squares with X.

The seasonal variation in *Campylobacter* spp. MPN is depicted in Table 3. For both years of the study, the highest prevalence of *Campylobacter* spp. in environmental water (55.2% in year 1 and 57.8% in year 2) and the highest proportion of samples with > 40.0 MPN/L (8.9% in year 1 and 7.9% in year 2) were found during fall, compared to the three other seasons.

TABLE 3. Seasonal variation in presence and most probable number (MPN) of *Campylobacter* spp. at all sampling sites.

Season	n	Proportion of positive samples (%) ^a	Proportion of samples with > 40.0 MPN/L (%) ^b
Year 1			
Summer	351	21.6	1.7
Fall	417	55.2	8.9
Winter	130	30.0	3.8
Spring	392	37.4	2.8
Year 2			
Summer	383	46.0	5.0
Fall	341	57.8	7.9
Winter	110	40.0	1.8
Spring	347	47.8	1.7

^aThere was a significant difference between the proportion of positive samples by season for year 1 ($P < 0.0001$) and for year 2 ($P = 0.0014$), using Chi-square 2-tail test.

^bThere was a significant difference between the proportion of samples with > 40.0 MPN of *Campylobacter* spp./L by season for year 1 ($P < 0.001$) and for year 2 ($P = 0.001$), using Chi-square 2-tail test.

The proportion of samples that yielded *Campylobacter* spp. was analyzed relative to the four levels of thermotolerant coliforms used to characterize water quality for recreational use (Figure 3). Over 70% of all samples were rated “excellent” water quality (0-20 thermotolerant coliforms per 100 ml) and only 12% were assessed as “poor” quality (> 200 thermotolerant coliforms per 100 ml). However, there was limited correlation between the water quality and the frequency of detecting *Campylobacter* (Kendall tau $c = 0.196$, $se = 0.018$; $P < 0.0001$). Over one-third of “excellent” quality samples were positive for *Campylobacter*, with rates exceeding 50% among samples classified as “good” and peaking at 65% among samples of “poor” quality.

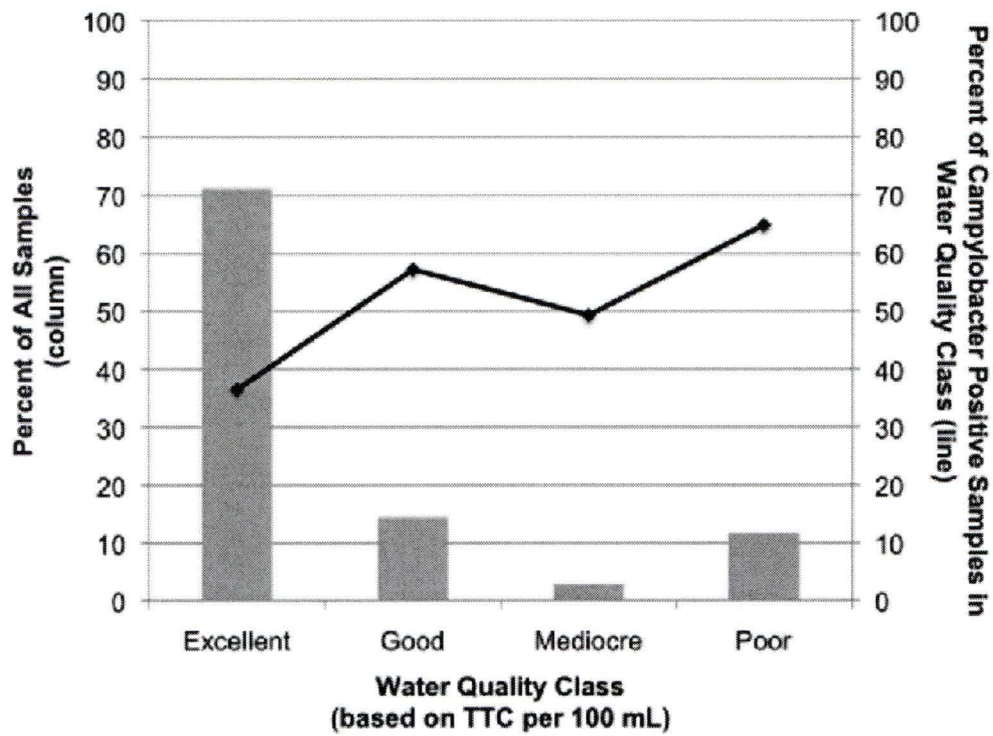


FIGURE 3. Percent of total samples in each water quality class (as defined by thermotolerant coliform (TTC) count level) and percent of samples in each water quality class positive for *Campylobacter* spp.

Samples were also assigned to four categories based on the estimated MPN/L of *Campylobacter* spp. Overall, 1,410 (56.8%) had < 0.4 MPN/L (lower limit of detection of the collection protocol); 629 (25.4%) had 0.4 to 4.0 MPN/L; 329 (13.3%), 4 to 40 MPN/L; and 113 (4.6%), > 40 MPN/L. Again, there was a limited association between the presence of increasing levels of *Campylobacter* and increasing levels of thermotolerant coliforms (Figure 4) (Kendall tau b = 0.233, se = 0.019; $P < 0.0001$). For example, among samples with > 40.0 MPN/L of *Campylobacter* spp., 44.2% were of poor water quality based on thermotolerant coliforms counts, compared with 7.3% among samples with no detectable *Campylobacter*.

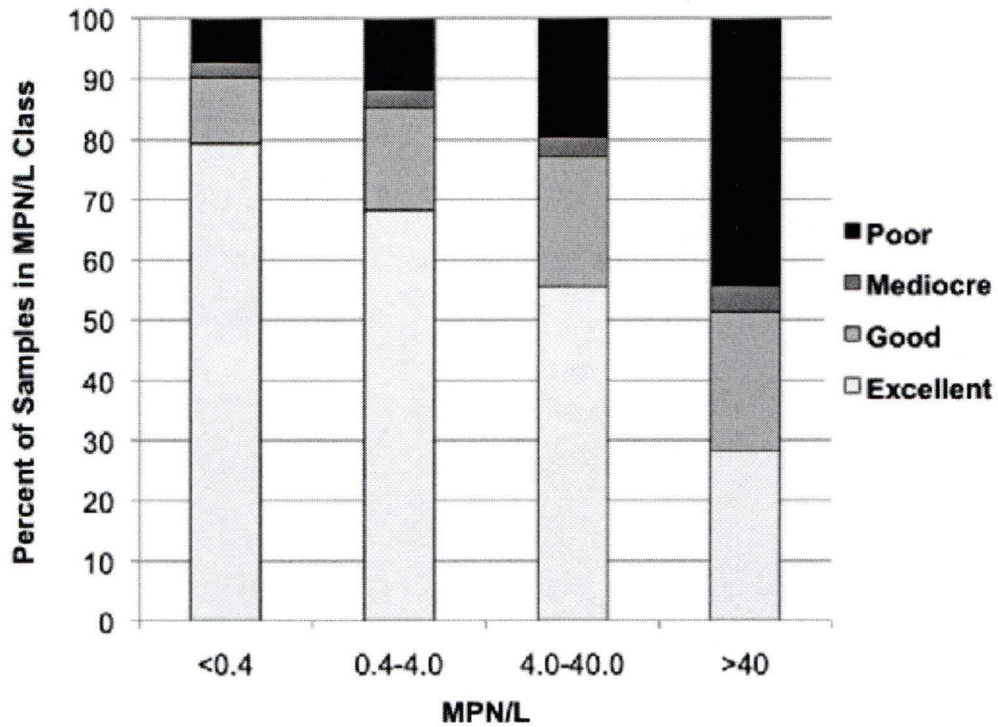


FIGURE 4. Proportion of samples in each thermotolerant coliform count level according to the *Campylobacter* spp. count category.

Physicochemical parameters analyses. Water temperatures at the time of collection varied between 0.4 and 30.6°C (median = 11.0°C; mean = 11.6 ± 7.6°C) and consistent with the year round collection protocol, the distribution of temperatures was relatively even. Considered in intervals of 5°C, the water temperature was 0-5°C in 26% of evaluable samples (temperature was unavailable for 189 (7%) of samples due to technical problems), 5.1-10.0°C in 18%, 10.1-15.0°C in 14%, 15.1-20.0°C in 20%, 20.1-25.0°C in 12%, and >25°C in 3%. Figure 5 shows the frequency of samples at each temperature level positive for *Campylobacter* spp., thermotolerant coliforms and *E. coli*. Temperature had only a modest impact on recovery of coliforms, with ~50% of samples under 10°C being positive, compared with 60-70% among warmer samples. In contrast, the frequency of samples positive for *Campylobacter* spp. was 40% for the coldest interval (0-5°C), peaked at 60% for samples 5-10°C, and then declined steadily with increasing temperature, with organisms recovered from only 5% of samples > 25°C ($P < 0.0001$, as determined by Chi-square). For each level of water temperature, the proportion of positive samples for *Campylobacter* spp. was statistically different from that for thermotolerant coliforms and *E. coli* ($P < 0.02$).

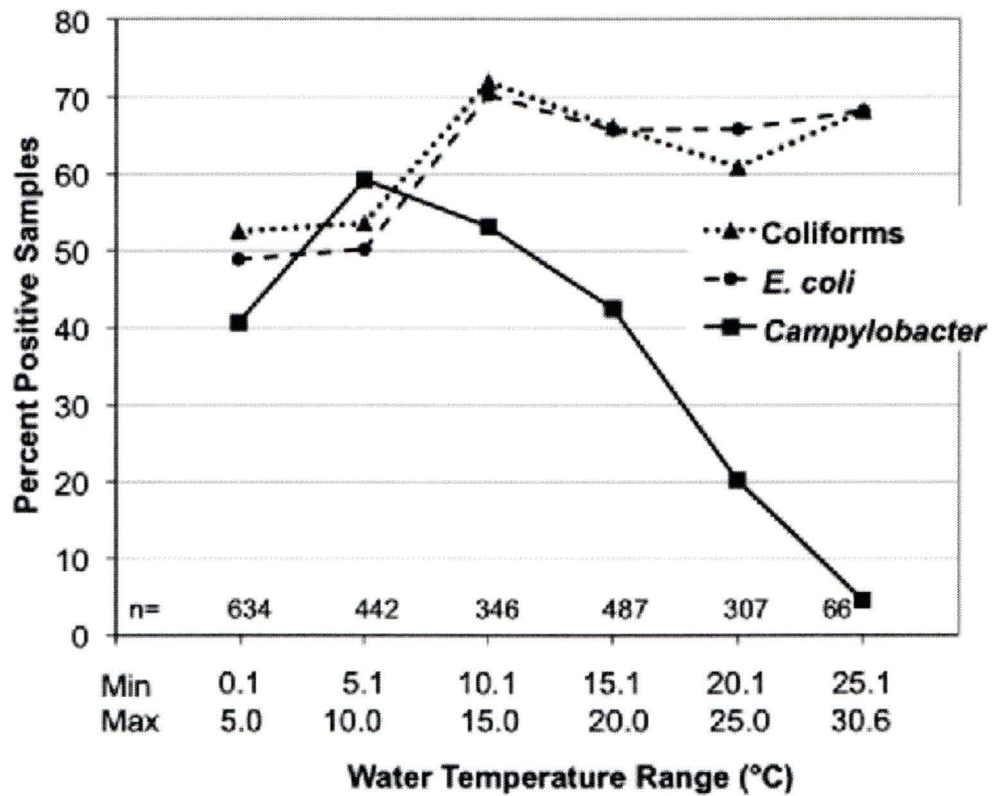


FIGURE 5. Distribution of positive site samples for *Campylobacter* spp., thermotolerant coliforms (TTC) and *E. coli* at various levels of water temperature. The “n=” indicate the total number of site samples at each level of water temperature.

The water turbidity varied from 0 to 981 NTU (median = 6 NTU; mean = 18 ± 51 NTU) among 2,164 evaluable samples; no data was available for 307 (12%) site samples due to technical problems. Most samples had low turbidity, with 0-5 NTU observed in 42%, 6-25 NTU in 33%, 26-50 NTU in 7%, 51-75 NTU in 3%, 76-125 NTU in 1%, and > 125 NTU in 2%. Figure 6 shows the frequency of samples at each level of turbidity positive for *Campylobacter* spp., thermotolerant coliforms and *E. coli*. For each class of organisms, the frequency of positive samples increased modestly as turbidity increased from 0-5 NTU through 26-50 NTU; across this range, recovery of *Campylobacter* spp. was significantly less frequent than coliforms ($P = 0.0001$, Chi square). At higher turbidities, there was no consistent trend in recovery of organisms.

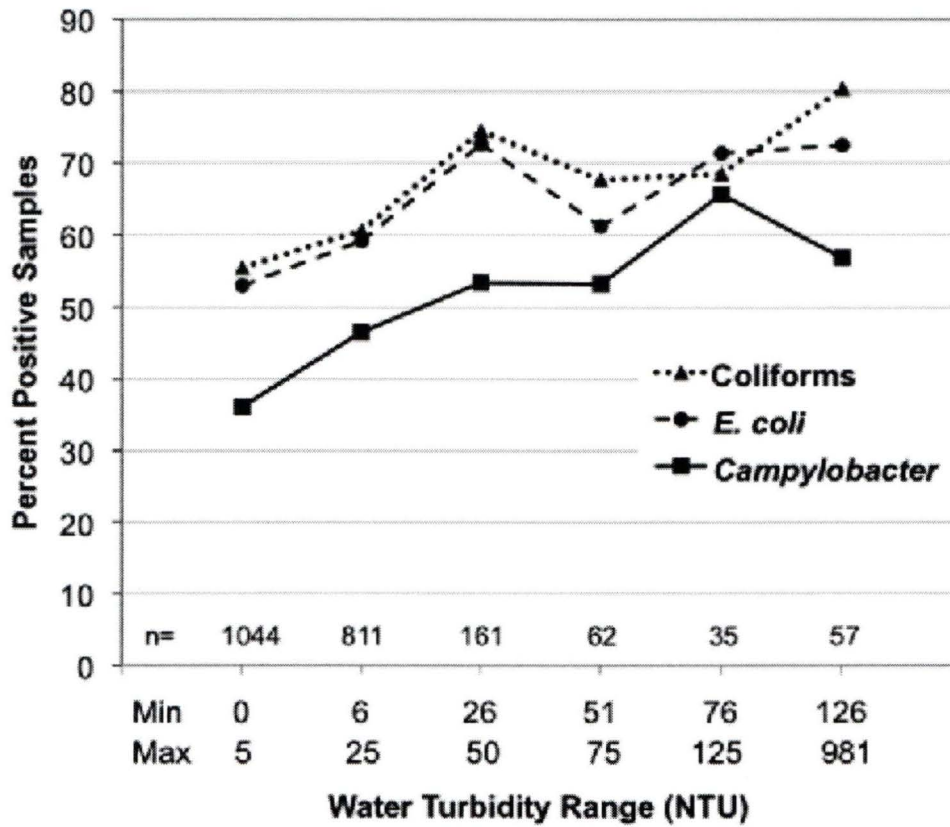


FIGURE 6. Distribution of positive site samples for *Campylobacter* spp., thermotolerant coliforms (TTC) and *E. coli* at various levels of water turbidity. The “n=” indicate the total number of site samples at each level of water turbidity.

Well water analyses. A total of 183 well water samples were analyzed (53 from surface wells, 120 from groundwater wells and 10 for which the type of well was not specified). Overall, 87% of the wells (75% of the surface wells, 83% of the groundwater wells and 90% of the unspecified wells) served for human consumption, whereas the others served for animal consumption. Five of the 53 surface well water samples (three dedicated to human consumption, and two serving for animal consumption) were positive for *C. jejuni*, of which only two were positive for thermotolerant coliforms (78 CFU/100 ml and > 200 CFU/100 ml); 14 of the surface wells that were negative for *Campylobacter* spp. were positive for thermotolerant coliforms. The groundwater wells and the unspecified wells were all negative for *Campylobacter* spp., but thermotolerant coliforms were found among 10 of the groundwater wells.

Discussion

Campylobacteriosis is a clinically and epidemiologically significant cause of gastrointestinal illness. Although acute point-source outbreaks involving poultry as well as water contamination are well-described, the majority of cases represent sporadic disease with no clear source. The standard methods for assessing water quality rely on the detection of thermotolerant coliforms and *E. coli*. Direct assays for *Campylobacter* are not commonly used in public health surveys on the assumption that coliforms represent an adequate surrogate for contamination with enteric pathogens. Our comprehensive analysis of over 2,400 environmental water samples collected weekly over two years indicates this is an incorrect assumption and suggests that deciphering the sources for sporadic cases of campylobacteriosis will require genus specific techniques.

Studies of environmental water typically emphasize on rivers, which are widely used for recreation and from which water is frequently abstracted to supplement the potable water supply. Although multiple publications have compared the prevalence of *Campylobacter* spp. and fecal pollution indicators (4, 9, 11, 12, 16, 17, 24, 31, 32, 34, 40, 42, 45, 51), they have been substantially more limited in the total number of specimens and sites as well as the frequency and duration of sampling. Further, they have used less comprehensive detection methods and emphasized different approaches to the analysis of the data.

Prior studies that reported an association between *Campylobacter* and coliforms in environmental waters have often used multiple logistic regression or similar analytic approaches (11, 42, 45, 51). For example, TILL *et al.*, 2008 (51) using a general linear model, showed that the concentration of *Campylobacter* correlated with the concentration of *E. coli*. However, the correlation varied widely across seasons (tending to be higher in the bathing season) and among catchment types (e.g., urban, birds, dairying, sheep/pastoral and forestry/undeveloped) and was poor for those catchment types where *Campylobacter* concentrations tended to be low, although stronger when *Campylobacter* concentrations were high.

It is plausible that the presence of *Campylobacter* correlates with fecal indicator organisms after adjusting for confounding factors (e.g., location, season, rainfall and agricultural practice). However, environmental laboratories do not consider such factors when describing water quality, but rather focus on thermotolerant coliform counts to assess the safety of untreated water used for

drinking or recreational purposes. We chose not to use regression models to evaluate the relationship between *Campylobacter* and fecal indicator organisms, so that we could assess the results of *Campylobacter* detection against the same metric that environmental laboratories use when reporting the microbiological quality of 100 ml of raw water. Other studies that have not used regression techniques have observed, as we did, no correlation between indicator organisms and the presence of *Campylobacter* in raw surface water (4, 9, 12, 16, 17, 24, 31, 32, 34, 40). We conclude that the presence or absence of thermophilic *Campylobacter* cannot be inferred from the results of monitoring of raw water using fecal indicator organisms or turbidity.

The poor correlation between the thermophilic *Campylobacter* and coliforms in natural waters likely reflects multiple factors. DORNER *et al.*, 2007 observed that *Campylobacter* levels in the Grand River watershed, Ontario, Canada frequently peaked before coliforms and turbidity and then become undetectable sooner (16). This pattern suggests that *Campylobacter* and potentially other pathogens are limited in supply and are flushed out of the stream before the coliform bacteria. Following storm events peak pathogen concentrations may not coincide with peak turbidity because the pathogens are not evenly distributed across a watershed, but rather clustered in space and time, possibly as a function of variations in animal host populations (16). Technical factors may also act to weaken the observed correlation between *Campylobacter* and fecal indicators. Examples include culturing an inadequate number or volume of samples (22) or different rates of survival and recovery of pathogens compared with those of fecal indicators.

We observed a marked seasonal pattern in the levels of *Campylobacters* in temperate, aquatic environments. Thermophilic *Campylobacters* can survive but not multiply at the lower temperatures characteristic of natural waters (9); consequently, the effects of temperature are complex. BLASER *et al.*, 1980 observed that *C. jejuni* survived in water for 1 to over 4 weeks at 4°C , but could only be recovered up to 4 days at 25°C (7). Extended survival in cold streams may also enable *Campylobacter* spp. to overwinter in cold, slow-moving, low-oxygenated aquifers and re-enter animal hosts in the spring (37). Other factors contributing to seasonal variations in *Campylobacter* in river systems may include predation by protozoa, lethal UV light levels (49), the prevalence of carrier animals on adjacent lands and the volume of rainfall run-off. Birds, which are carriers of *C. jejuni*, *C. lari* and *C. coli*, may also contaminate watershed areas (22, 53). In our study, many urban sampling sites that were not frozen during winter were frequented by gulls; the impact of this will be examined further in our GIS model.

In re-evaluating contaminated water supplies as a source of sporadic cases of *Campylobacter*, it is important to consider the pathogenesis of these infections. In human volunteer studies *Campylobacter* demonstrate a classic sigmoid-shaped dose-response curve with an estimated 50% infectious dose (ID₅₀) of ~ 800 organisms (5, 36, 47). The probability of contracting infection following exposure to one *Campylobacter* organism has been estimated to be ~ 1 in 150 (38). However, the infection dose-response relation has been recently updated based on two raw milk outbreaks in children, and indicates higher (~ 36 times more) probabilities of infection at low doses than previously estimated (48). Thus, ingestion of water or food that contains even very small numbers of *Campylobacter* cells may be a potential health

hazard and sensitive methods are needed to evaluate environmental and drinking water sources.

In 2000, a notable waterborne outbreak of *Campylobacter* in Walkerton, Ontario was linked to fecally contaminated well water (3, 14). Our limited data suggests that the risk of contamination by *Campylobacter* may be greater for surface wells compared to deep wells. In well water, as with surface water, we observed a poor correlation between the presence of *Campylobacter* and thermotolerant coliforms, with the latter being detectable in only 2 of the 5 surface wells positive for *Campylobacter* spp. These results further emphasize the potential for missing epidemiologically significant sources if testing for *Campylobacter* is not a routine procedure when assessing the quality of untreated drinking water.

However, the methods for the detection and quantification of *Campylobacter* in water require further development. The MPN method is fastidious, time-consuming (approximately one and a half week to have a confirmed result), imprecise, and, consequently, is unsuitable for widespread implementation in public health and environmental laboratories. Real-time PCR based on gene coding for 16S rRNA is a potential alternative. We evaluated PCR using three different collection volumes (2,000, 500 and 10 ml). The largest volume provided the best results, with a sensitivity and a specificity of 93% and 95%, respectively, compared to culture. If, in some water samples, the growth of *Campylobacter* species was inhibited by other bacteria or if the organisms were in a viable but nonculturable form of *Campylobacter*, our observations may underestimate the specificity of PCR.

In summary, our comprehensive survey of untreated environmental waters documents a high prevalence of *Campylobacter*. Given the low infectious dose for these pathogens, such waters might be a significant source of sporadic infections in humans, which remain largely unexplained. However, there are numerous unresolved issues regarding the epidemiologic and pathogenic significance of environmental *Campylobacter* (28). We are currently comparing the molecular characteristics of these environmental organisms with clinical pathogens and integrating our observational studies using geographic information systems. The goal of this multidisciplinary approach is to provide a basis for assessing the public health value of routinely testing raw surface water for the presence of *Campylobacter*.

Acknowledgments

This study was funded by the Canadian Institutes of Health Research, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Centre de Recherche Clinique Étienne Le-Bel du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. We thank the Laboratoire d'analyse S. M. inc., Polylab Experts, Biolab division Thetford, Mr. Roberto Toffoli (MAPAQ), the nurses of the Public Health of Québec involved in our project and all the participants for their collaboration to provide us with drinking water samples. We thank Juan M. Gonzalez for generously providing us the MPN Table needed for our analyses. We also warmly thank Feridoon Zokeai Arani, Maya Zabinski, and Sylvie Deslandes for technical assistance, the other members of the CampyloGIS project (Goze Béné, Ferdinand Bonn, Olivier Thomas, Sylvain Quessy, François Milord, Suzanne Ménard, Jacques Désilets, Michel Pomerleau, André Lavoie, Rémi Desbiens, and Djoan Bonfils) and the trainees for their advice and efficient work.

References

1. **Allerberger, F., N. Al-Jazrawi, P. Kreidl, M. P. Dierich, G. Feierl, I. Hein, and M. Wagner.** 2003. Barbecued chicken causing a multi-state outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis. *Infect* **31**:19-23.
2. **Altekruse, S. F., N. J. Stern, P. I. Fields, and D. L. Swerdlow.** 1999. *Campylobacter jejuni*--an emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis* **5**:28-35.
3. **Anonymous.** 2000. Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal water supply, Walkerton, Ontario, May-June 2000. *Can Commun Dis Rep* **26**:170-3.
4. **Arvanitidou, M., G. A. Stathopoulos, T. C. Constantinidis, and V. Katsouyannopoulos.** 1995. The occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. in river and lake waters. *Microbiol Res* **150**:153-8.
5. **Black, R. E., M. M. Levine, M. L. Clements, T. P. Hughes, and M. J. Blaser.** 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis* **157**:472-9.
6. **Blaser, M. J.** 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J Infect Dis* **176 Suppl 2**:S103-5.
7. **Blaser, M. J., H. L. Hardesty, B. Powers, and W. L. Wang.** 1980. Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *J Clin Microbiol* **11**:309-13.
8. **Blaser, M. J., D. N. Taylor, and R. A. Feldman.** 1983. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. *Epidemiol Rev* **5**:157-76.

9. **Bolton, F. J., D. Coates, D. N. Hutchinson, and A. F. Godfree.** 1987. A study of thermophilic campylobacters in a river system. *J Appl Bacteriol* **62**:167-76.
10. **Bolton, F. J., P. M. Hinchliffe, D. Coates, and L. Robertson.** 1982. A most probable number method for estimating small numbers of campylobacters in water. *J Hyg (Lond)* **89**:185-90.
11. **Brennhovd, O., G. Kapperud, and G. Langeland.** 1992. Survey of thermotolerant *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in three surface water sources in Norway. *Int J Food Microbiol* **15**:327-38.
12. **Carter, J. M., R. E. Pacha, G. W. Clark, and E. A. Williams.** 1987. Seasonal occurrence of *Campylobacter* spp. in surface waters and their correlation with standard indicator bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **53**:523-526.
13. **Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec.** 2005. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux (thermotolérants) et confirmation à l'espèce *Escherichia coli*: méthode par filtration sur membrane. MA. 700-Fec.Ec 1.0, Rév. 2. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec.
14. **Clark, C. G.** 2003. Characterization of waterborne outbreak-associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario. *Emerg Infect Dis* **9**:1232-41.
15. **Comité provincial sur l'entérite à *Campylobacter* au Québec.** 1999. L'entérite à *Campylobacter* au Québec: état de situation et propositions d'action. Comité provincial sur l'entérite à *Campylobacter* au Québec.

16. **Dorner, S. M., W. B. Anderson, T. Gaulin, H. L. Candon, R. M. Slawson, P. Payment, and P. M. Huck.** 2007. Pathogen and indicator variability in a heavily impacted watershed. *J Water Health* **5**:241-57.
17. **Eyles, R., D. Niyogi, C. Townsend, G. Benwell, and P. Weinstein.** 2003. Spatial and temporal patterns of *Campylobacter* contamination underlying public health risk in the Taieri River, New Zealand. *J Environ Qual* **32**:1820-8.
18. **Friedman, C., J. Neimann, C. Wegener, and R. Tauxe.** 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations, p. 121-138. *In* I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd Edition ed. ASM Press, Washington, DC.
19. **Frost, E. H., S. Deslandes, D. Bourgaux-Ramoisy, and P. Bourgaux.** 1995. Quantitation of *Chlamydia trachomatis* by culture, direct immunofluorescence and competitive polymerase chain reaction. *Genitourin Med* **71**:239-43.
20. **Gillespie, I. A., S. J. O'Brien, J. A. Frost, G. K. Adak, P. Horby, A. V. Swan, M. J. Painter, and K. R. Neal.** 2002. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses. *Emerg Infect Dis* **8**:937-42.
21. **Gonzalez, J. M.** 1996. A general purpose program for obtaining Most Probable Number tables. *J Microbiol Methods* **26**:215-218.
22. **Hanninen, M. L., H. Haajanen, T. Pummi, K. Wermundsen, M. L. Katila, H. Sarkkinen, I. Miettinen, and H. Rautelin.** 2003. Detection and typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and analysis of indicator organisms in three waterborne outbreaks in Finland. *Appl Environ Microbiol* **69**:1391-1396.

23. **Health Canada.** 2006. Guidelines for Canadian drinking water quality: Guideline technical document - Bacterial waterborne pathogens - Current and emerging organisms of concern. Water Quality and Health Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada.
24. **Horman, A., R. Rimhanen-Finne, L. Maunula, C. H. von Bonsdorff, N. Torvela, A. Heikinheimo, and M. L. Hanninen.** 2004. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. *Appl Environ Microbiol* **70**:87-95.
25. **Hutchinson, D. N., F. J. Bolton, P. M. Hinchliffe, H. C. Dawkins, S. D. Horsley, E. G. Jessop, P. A. Robertshaw, and D. E. Counter.** 1985. Evidence of udder excretion of *Campylobacter jejuni* as the cause of milk-borne campylobacter outbreak. *J Hyg (Lond)* **94**:205-15.
26. **Jones, I. G., and M. Roworth.** 1996. An outbreak of *Escherichia coli* O157 and campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. *Public Health* **110**:277-82.
27. **Lang, T. A., and M. Secic.** 1997. How to report statistics in medicine: annotated guidelines for authors, editors and reviewers. American College of Physicians, Philadelphia, PA.
28. **Levesque, S., E. Frost, R. D. Arbeit, and S. Michaud.** 2008. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol* **46**:3404-11.

29. **Lévesque, S., K. St-Pierre, E. Frost, and S. Michaud.** 2005. Determination of the optimal culture conditions for detecting *Campylobacter* spp. in environmental water, 13th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms, Gold Coast, Queensland, Australia.
30. **Lubeck, P. S., P. Wolffs, S. L. On, P. Ahrens, P. Radstrom, and J. Hoorfar.** 2003. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacters*: assay development and analytical validation. *Appl Environ Microbiol* **69**:5664-9.
31. **Martikainen, P. J., L. Korhonen, and T. U. Kosunen.** 1990. Occurrence of thermophilic campylobacters in rural and urban surface waters in Central Finland. *Water Res* **24**:91-96.
32. **Moore, J. E., P. S. Caldwell, B. C. Millar, and P. G. Murphy.** 2001. Occurrence of *Campylobacter* spp. in water in Northern Ireland: implications for public health. *Ulster Med J* **70**:102-7.
33. **Nachamkin, I.** 2003. *Campylobacter* and *Arcobacter*, p. 902-914. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, J. H. Jorgensen, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
34. **Obiri-Danso, K., and K. Jones.** 1999. Distribution and seasonality of microbial indicators and thermophilic campylobacters in two freshwater bathing sites on the River Lune in northwest England. *J Appl Microbiol* **87**:822-32.
35. **Pebody, R. G., M. J. Ryan, and P. G. Wall.** 1997. Outbreaks of campylobacter infection: rare events for a common pathogen. *Commun Dis Rep CDR Rev* **7**:R33-7.

36. **Robinson, D. A.** 1981. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. Br Med J **282**:1584.
37. **Rollins, D. M., and R. R. Colwell.** 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl Environ Microbiol **52**:531-8.
38. **Rose, J. B., and C. P. Gerba.** 1991. Use of risk assessment for development of microbial standards. Water Sci Technol **24**:23.
39. **Said, B., F. Wright, G. L. Nichols, M. Reacher, and M. Rutter.** 2003. Outbreaks of infectious disease associated with private drinking water supplies in England and Wales 1970-2000. Epidemiol Infect **130**:469-79.
40. **Savill, M. G., J. A. Hudson, A. Ball, J. D. Klena, P. Scholes, R. J. Whyte, R. E. McCormick, and D. Jankovic.** 2001. Enumeration of *Campylobacter* in New Zealand recreational and drinking waters. J Appl Microbiol **91**:38-46.
41. **Skirrow, M. B., R. G. Fido, and D. M. Jones.** 1981. An outbreak of presumptive food-borne campylobacter enteritis. J Infect **3**:234-6.
42. **Skjerve, E., and O. Brennhovd.** 1992. A multiple logistic model for predicting the occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in water. J Appl Bacteriol **73**:94-8.
43. **Slater, E. R., and R. J. Owen.** 1997. Restriction fragment length polymorphism analysis shows that the hippuricase gene of *Campylobacter jejuni* is highly conserved. Lett Appl Microbiol **25**:274-8.
44. **Stehr-Green, J. K., C. Nicholls, S. McEwan, A. Payne, and P. Mitchell.** 1991. Waterborne outbreak of *Campylobacter jejuni* in Christchurch: the importance of a combined epidemiologic and microbiologic investigation. N Z Med J **104**:356-8.

45. **Stelzer, W., H. Mochmann, U. Richter, and H. J. Dobberkau.** 1989. A study of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in a river system. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **189**:20-8.
46. **Tauxe, R. V.** 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations, p. 9-19. *In* I. Nachamkin, M. J. Blaser, and L. S. Tompkins (ed.), *Campylobacter jejuni* - current status and future trends. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
47. **Teunis, P., A. Havelaar, J. Vliegenthart, and G. Roessink.** 1997. Risk assessment of *Campylobacter* species in shellfish: Identifying the unknown. *Water Sci Technol* **35**:29-34.
48. **Teunis, P., W. Van den Brandhof, M. Nauta, J. Wagenaar, H. Van den Kerkhof, and W. Van Pelt.** 2005. A reconsideration of the *Campylobacter* dose-response relation. *Epidemiol Infect* **133**:583-92.
49. **Thomas, C., H. Gibson, D. J. Hill, and M. Mabey.** 1999. *Campylobacter* epidemiology: an aquatic perspective. *J. Appl. Microbiol. Symp.* **85**:168S-177S.
50. **Thomas, M. K., S. E. Majowicz, P. N. Sockett, A. Fazil, F. Pollari, K. Dore, J. A. Flint, and V. L. Edge.** 2006. Estimated numbers of community cases of illness due to *Salmonella*, *Campylobacter* and verotoxigenic *Escherichia coli*: Pathogen-specific community rates. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **17**:229-34.
51. **Till, D., G. McBride, A. Ball, K. Taylor, and E. Pyle.** 2008. Large-scale freshwater microbiological study: rationale, results and risks. *J Water Health* **6**:443-460.

52. **Vogt, R. L., H. E. Sours, T. Barrett, R. A. Feldman, R. J. Dickinson, and L. Witherell.** 1982. *Campylobacter* enteritis associated with contaminated water. *Ann Intern Med* **96**:292-6.
53. **Waldenstrom, J., T. Broman, I. Carlsson, D. Hasselquist, R. P. Achterberg, J. A. Wagenaar, and B. Olsen.** 2002. Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Appl Environ Microbiol* **68**:5911-7.

CHAPITRE 2

APPROCHE MOLÉCULAIRE POUR L'IDENTIFICATION DE 5 ESPÈCES DE CAMPYLOBACTER PAR PCR HIPPURATE, PCR 16S ET PCR-RFLP

Introduction

L'identification à l'espèce adéquate des isolats de *Campylobacter* provenant, entre autres, de cas humains est très importante tant au niveau du souci de faire le bon diagnostic que dans le but de parfaire nos connaissances pour pouvoir ultimement mettre en place des mesures efficaces de prévention des infections à *Campylobacter*. En effet, chaque espèce de *Campylobacter* est généralement associée à un réservoir animal particulier. Par exemple, le *C. jejuni* est principalement retrouvé chez le poulet, le *C. coli* chez le porc, et le *C. lari* chez les goélands (NACHAMKIN et BLASER, 2000). Ainsi, l'identification à l'espèce peut permettre de mieux comprendre les routes de transmission de la maladie afin de tenter de déterminer quels sont les facteurs de risques et quelles sont les sources probables de *Campylobacter*. Ces données pourraient permettre de trouver des pistes qui permettraient d'établir des liens épidémiologiques entre une source probable d'infection et un cas humain. L'identification à l'espèce peut également permettre de faire la surveillance des isolats résistants aux antibiotiques, afin de pouvoir appliquer une antibiothérapie adéquate à la situation et ainsi tenter de réduire l'émergence d'isolats résistants aux antibiotiques (STEINHAUSEROVA *et al.*, 2001) (ON et JORDAN, 2003) (KOS *et al.*, 2006).

Les 5 principales espèces de *Campylobacter* identifiées lors du diagnostic des cas humains de campylobacteriose dans le monde sont *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* et *C. fetus* et elles sont respectivement observées dans environ 80-90%, 5-10%, 0,8%, 0,1% et 0,1% des cas humains répertoriés (NACHAMKIN et BLASER, 2000) (MURRAY *et al.*, 2003). Dans les laboratoires cliniques des hôpitaux, lorsque l'identification à l'espèce du *Campylobacter* est réalisée, elle est traditionnellement déterminée via l'utilisation de tests biochimiques de routine, c'est-à-dire avec les tests d'oxydase, de catalase, d'hydrolyse de l'indoxyle acétate et de l'hippurate de sodium en tube et la résistance à l'acide nalidixique et à la céphalotine (NACHAMKIN et BLASER, 2000) (MURRAY *et al.*, 2003). Les caractéristiques phénotypiques habituellement observées pour chacune des 5 principales espèces de *Campylobacter* d'intérêt médical, avec l'utilisation des 6 tests biochimiques de routine, sont listées dans le tableau 4. Il est intéressant de remarquer que peu de tests permettent la distinction entre les 5 espèces de *Campylobacter* et ce, entre autres, à cause du fait que le genre *Campylobacter* est très peu actif métaboliquement (NACHAMKIN *et al.*, 1992) (CARDARELLI-LEITE *et al.*, 1996) (ON, 1996) (STEINHAUSEROVA *et al.*, 2001) (KARENLAMPI *et al.*, 2004).

TABEAU 4. Caractéristiques phénotypiques générales et quelques divergences phénotypiques possibles (rectangles noirs) pour l'identification à l'espèce des 5 principales espèces de *Campylobacter* d'intérêt médical et ce, avec l'utilisation des 6 tests biochimiques de routine (NACHAMKIN et BLASER, 2000) (DUIM *et al.*, 2004) (RONNER *et al.*, 2004).

Espèce	Oxydase	Catalase	Indoxyle acétate	Hippurate de sodium	Acide nalidixique	Céphalotine
<i>C. jejuni</i>	+	+	+	+	S	R
				4-5% -	↑ R	
<i>C. coli</i>	+	+	+	-	S	R
					↑ R	
<i>C. lari</i>	+	+	-	-	R	R
			7% +		NASC	
<i>C. upsaliensis</i>	+	-	+	-	S	S
		Faible +			↑ R	↑ R
<i>C. fetus</i>	+	+	-	-	R	S

+ : Résultat positif

- : Résultat négatif

NASC : « Nalidixic acid-susceptible campylobacters »

S : Sensible à l'antibiotique

R : Résistant à l'antibiotique

↑ R : Augmentation de la résistance à l'antibiotique

Les caractéristiques phénotypiques peuvent varier au sein d'une même espèce bactérienne et rendre l'identification à l'espèce plus complexe avec l'utilisation des tests biochimiques seuls. En effet, les cellules bactériennes sont confrontées à une multitude de pressions environnementales (rayons ultraviolets, milieu hostile, antibiotiques, etc.) ou évolutives (mutations, acquisition et/ou échange de matériels génétiques, etc.) qui peuvent mener à l'apparition de phénotypes bactériens atypiques (PRESCOTT *et al.*, 1995) (ON, 1996) (DRAKE *et al.*, 1998) (MOAT *et al.*, 2002).

Chez le *Campylobacter*, seul le *C. jejuni* est connu pour donner un résultat positif au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube, car c'est la seule espèce de *Campylobacter* connue qui possède le gène *hipO* codant pour la formation de l'enzyme hippuricase (PENNER, 1988) (HANI et CHAN, 1995) (SLATER et OWEN, 1997) (RONNER *et al.*, 2004) (KOS *et al.*, 2006). De ce fait, il serait le seul test biochimique à permettre la réelle distinction entre le *C. jejuni* et le *C. coli* (Tableau 4), deux espèces très proches génétiquement (SHEPPARD *et al.*, 2008). Cependant, il a été observé dans la littérature que 4 à 5% des *C. jejuni* donnent un résultat négatif au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube (Tableau 4), un phénomène qui peut être notamment dû à la troncation ou à une expression faible ou absente du gène *hipO* (SLATER et OWEN, 1997) (NACHAMKIN et BLASER, 2000) (RONNER *et al.*, 2004) (KOS *et al.*, 2006). De plus, de faux résultats positifs au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube peuvent être obtenus, notamment à cause d'acides aminés ou de peptides qui pourraient, soit être transférés d'un autre milieu de culture ou soit être produits au cours de l'incubation du test (MEGRAUD, 1987). Aussi, différents protocoles et méthodes sont utilisés pour mesurer l'activité enzymatique de l'hippuricase chez *C. jejuni* et cela peut causer des erreurs ou de la variation dans

l'interprétation subjective du résultat d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube (KODAKA *et al.*, 1982) (MORRIS *et al.*, 1985).

La résistance à l'acide nalidixique et à la céphalotine sont deux critères majeurs permettant la distinction entre les 5 espèces de *Campylobacter* d'intérêt médical. Cependant, notamment à cause de l'utilisation à grande échelle des fluoroquinolones dans l'industrie agricole et dans la médecine humaine et vétérinaire, une augmentation de la résistance à l'acide nalidixique est observée chez *C. jejuni*, *C. coli* et *C. upsaliensis* (Tableau 4) (ENDTZ *et al.*, 1991) (NACHAMKIN et BLASER, 2000) (ALFREDSON et KOROLIK, 2007). De plus, environ 10 à 15% de *C. upsaliensis* résistants à la céphalotine ont été décrits dans la littérature, ce qui peut d'autant plus compliquer la différenciation entre *C. coli* et *C. upsaliensis* (ON, 1996). L'émergence d'isolats résistants aux antibiotiques complique non seulement l'identification à l'espèce adéquate des isolats de *Campylobacter* et la documentation exacte des cas humains de campylobactériose par la santé publique, mais également le traitement dans certains cas.

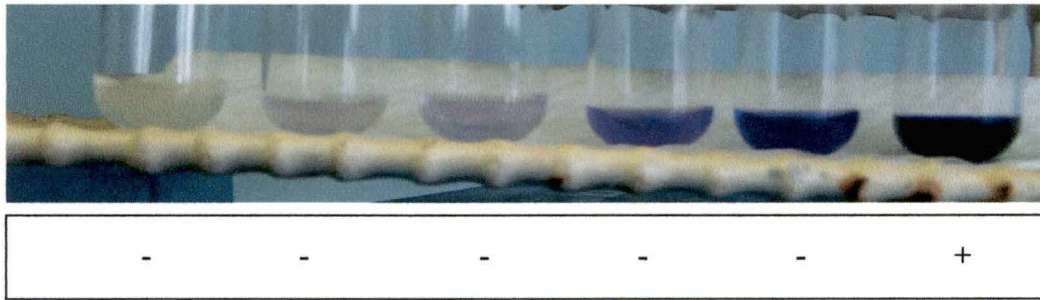
Chez *C. lari*, 7% des isolats donnent un résultat positif au test d'hydrolyse de l'indoxyle acétate (Tableau 4), un test biochimique déterminant pour l'identification adéquate de cette espèce (NACHAMKIN et BLASER, 2000). Quoique leur épidémiologie soit encore méconnue, des isolats de *C. lari* sensibles à l'acide nalidixique (Nalidixic acid-susceptible campylobacters ou NASC) (Tableau 4) ont récemment été répertoriés principalement dans l'eau, chez des mollusques, des goélands, mais également chez quelques cas humains (MEGRAUD *et al.*, 1988) (ENDTZ *et al.*, 1997) (DUIM *et al.*, 2004) (MATSUDA et MOORE, 2004). La rareté

des cas humains infectés par le *C. lari* NASC est peut-être en partie due au fait que les laboratoires cliniques de microbiologie ne poussent pas toujours l'identification du *Campylobacter* jusqu'à l'espèce (ENDTZ *et al.*, 1997) (FERMER et ENGVALL, 1999) (STEINHAUSEROVA *et al.*, 2001). Finalement, chez *C. upsaliensis*, des isolats donnant un faible résultat positif au test de la catalase ont également déjà été répertoriés (Tableau 4) (NACHAMKIN et BLASER, 2000).

En plus des phénotypes atypiques, le « facteur humain » peut également entraîner des difficultés dans l'identification à l'espèce du *Campylobacter* si les tests biochimiques sont utilisés seuls. En effet, à cause du manque de standardisation des tests biochimiques, plusieurs travailleurs préparent et réalisent ces tests d'une façon qui est spécifique à leur laboratoire, c'est-à-dire que la reproductibilité et la constance des résultats obtenus peuvent être compromises à cause des variations dans la méthodologie et dans l'interprétation subjective des tests (Figure 7) (ON, 1996) (LINTON *et al.*, 1997) (STEINHAUSEROVA *et al.*, 2001) (NAKARI *et al.*, 2008).

De ces faits, l'identification à l'espèce du *Campylobacter* en utilisant seulement des tests biochimiques peut être problématique et entraîner une mauvaise identification des isolats de *Campylobacter* (DENIS *et al.*, 1999) (KARENLAMPI *et al.*, 2004). Les méthodes moléculaires semblent donc nécessaires pour améliorer les techniques d'identification à l'espèce du *Campylobacter*. En effet, elles ont l'avantage d'être basées sur l'analyse de caractères génotypiques, ce qui les rend plus fiables, plus reproductibles et facile à standardiser (LINTON *et al.*, 1997) (KOS *et al.*, 2006). Également, les méthodes moléculaires sont généralement plus rapides et elles peuvent aussi être automatisées (LUBECK *et al.*, 2003).

A



B

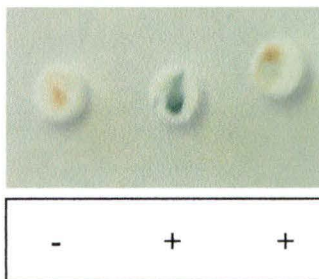


FIGURE 7. Deux tests biochimiques de routine dont l'interprétation subjective, faite par une personne non-initiée ou peu attentive, peut fausser l'identification à l'espèce du *Campylobacter*. Ces résultats ont été obtenus au cours de ma maîtrise. **A.** Différents résultats obtenus pour le test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube. **B.** Différents résultats obtenus pour le test d'hydrolyse de l'indoxyle acétate. + : Résultat positif. - : Résultat négatif.

Plusieurs équipes de recherche ont déjà développé différentes méthodes moléculaires pour perfectionner l'identification à l'espèce du *Campylobacter* (ON, 1996), comme par exemple la PCR conventionnelle (LUBECK *et al.*, 2003) ou multiplexe (WANG *et al.*, 2002), l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) (HANNINEN *et al.*, 2003), le MLST (MILLER *et al.*, 2005), le polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP) (DUIM *et al.*, 2001) ou encore le séquençage du gène de la sous-unité ribosomale 16S (ARNr 16S) (GORKIEWICZ *et al.*, 2003) ou du gène *cpn60* (HILL *et al.*, 2006), pour ne nommer que celles-là. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), quant à lui, semblait être une méthode avantageuse et pratique pour compléter l'identification à l'espèce du *Campylobacter*, car elle est peu coûteuse, simple et rapide à exécuter, contrairement aux autres méthodes ou protocoles qui peuvent être complexes, longs, coûteux, difficile à instaurer ou à reproduire dans les laboratoires ou qui ne permettent simplement pas la différenciation des 5 principales espèces de *Campylobacter* d'intérêt médical.

Les protocoles de RFLP déjà publiés comportaient certaines lacunes et/ou désavantages. Par exemple, certains ne permettaient pas la distinction entre *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* et *C. fetus* (LINTON *et al.*, 1997) (FERMER et ENGVALL, 1999) (STEINHAUSEROVA *et al.*, 2001) (GONZÁLEZ *et al.*, 2006), d'autres nécessitaient l'utilisation de plus d'une enzyme de restriction (CARDARELLI-LEITE *et al.*, 1996) (FERMER et ENGVALL, 1999) (MARSHALL *et al.*, 1999) (KARENLAMPI *et al.*, 2004) (GONZÁLEZ *et al.*, 2006) (KAWASAKI *et al.*, 2008), ce qui complexifiait le RFLP ou encore, n'avaient été testés que sur des souches de référence (KAWASAKI *et al.*, 2008) ou seulement sur un nombre restreint

d'isolats (CARDARELLI-LEITE *et al.*, 1996) (LINTON *et al.*, 1997) (FERMER et ENGVALL, 1999) (MARSHALL *et al.*, 1999) (STEINHAUSEROVA *et al.*, 2001) (KARENLAMPI *et al.*, 2004) (GONZÁLEZ *et al.*, 2006). Ainsi, chaque équipe de recherche, à sa façon, a tenté de développer une seule méthode qui permettrait d'identifier le *Campylobacter* à l'espèce. Cependant, le consensus émergent stipule qu'il n'y aurait présentement pas de méthode parfaite qui permettrait l'identification précise à l'espèce du *Campylobacter*. Actuellement, il est donc nécessaire d'utiliser plus d'une méthode pour s'assurer de l'identification à l'espèce exacte du *Campylobacter* (ON, 1996) (LINTON *et al.*, 1997) (DENIS *et al.*, 1999) (STEINHAUSEROVA *et al.*, 2001) (ON et JORDAN, 2003) (KOS *et al.*, 2006).

L'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrie a permis, à elle seule, de recueillir 1071 isolats de *Campylobacter*, dont 128 (12%) isolats n'avaient pas pu être identifiés à l'espèce avec les 6 tests biochimiques de routine seuls. Il fallait donc trouver une méthode moléculaire simple, rapide et peu coûteuse pour compléter et confirmer l'identification à l'espèce de ces isolats au laboratoire. Étant donné les désavantages et/ou les lacunes des méthodes moléculaires déjà publiées et partant du principe qu'il faut plus d'une méthode pour s'assurer de l'exactitude de l'identification à l'espèce du *Campylobacter*, ce projet visait à développer une approche moléculaire pour l'identification à l'espèce de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* et *C. fetus*. La stratégie de cette approche consistait, dans un premier temps, à faire l'identification à l'espèce des isolats de *Campylobacter* avec les tests biochimiques de routine. Par la suite, l'application d'une PCR déjà publiée et basée sur la détection du gène *hipO* spécifique à *C. jejuni* (PCR hippurate) devait permettre de valider l'identification des

C. jejuni faite par les tests biochimiques. Ensuite, l'application de la PCR de détection du gène de l'ARNr 16S (PCR 16S), permettant la détection et non la différenciation de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*, devait permettre de faire la distinction entre les *C. coli* et *C. lari* et les *C. upsaliensis* et *C. fetus*, c'est-à-dire les isolats donnant un résultat négatif à la PCR hippurate et au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube. Finalement, le développement d'une PCR basée sur la détection du gène de la sous-unité ribosomale 23S du *Campylobacter* (PCR 23S) combinée à un RFLP (PCR-RFLP) utilisant une seule enzyme de restriction, soit *AhaI*, devait permettre de confirmer l'identification des isolats « hippurate-négatifs ».

Dans les cas où il y avait divergence entre l'identification obtenue par les tests biochimiques et celle obtenue par l'approche moléculaire (PCR hippurate, PCR-RFLP et PCR 16S), des méthodes moléculaires plus complexes et plus coûteuses à réaliser, comme le séquençage d'une portion du gène de l'ARNr 16S, trois techniques de MLST et/ou une PCR multiplexe, ont été utilisées dans le but de valider l'identification à l'espèce des isolats de *Campylobacter* problématiques. Le séquençage du gène de l'ARNr 16S est la méthode de référence pour l'étude de la phylogénie et de la taxonomie bactérienne. Cette technique permet de comparer les séquences avec une base de données internationale et ainsi obtenir une « mesure de similarité » de la séquence d'ADN permettant de faire une identification au genre et à l'espèce. Cependant, un nombre limité d'études (DRANCOURT *et al.*, 2000) (WOO *et al.*, 2003) (MIGNARD et FLANDROIS, 2006) suggèrent que le séquençage du gène de l'ARNr 16S permettrait l'identification au genre dans plus de 90% des cas et l'identification à l'espèce dans 65 à 83% des cas, mais 1 à 14% des isolats demeureraient non-identifiés avec cette technique (PATEL, 2001) (CLARRIDGE,

2004) (GARRITY *et al.*, 2005) (JANDA et ABBOTT, 2007) (LAMORIL *et al.*, 2008). Le MLST, quant à lui, est la méthode de référence pour l'analyse des populations génétiques bactériennes à long terme et permet d'étudier la variation génétique neutre de multiples loci chromosomiques. Le MLST compare directement les variations des séquences d'ADN d'une série de gènes et permet de caractériser les *Campylobacter* selon un profil allélique unique. Les séquences sont comparées sur une base de données internationale et une relation génétique entre les isolats peut être faite (DINGLE *et al.*, 2001a) (MILLER *et al.*, 2005). Dans le cas du *Campylobacter*, le MLST est à l'origine une technique d'épidémiologie moléculaire pour le typage du *C. jejuni* (DINGLE *et al.*, 2001a). Cependant, étant donné que des systèmes récents de MLST ont été développés entre autres pour *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* (MILLER *et al.*, 2005) et *C. fetus* (VAN BERGEN *et al.*, 2005), il est possible de se servir de cette méthode aussi comme outil d'identification à l'espèce. Cependant, la recombinaison génétique est fréquente chez le genre *Campylobacter* et ce, même à travers les différentes espèces, ce qui peut faire en sorte que des allèles de *C. coli* peuvent être retrouvés chez *C. jejuni*, par exemple, et complexifier l'identification à l'espèce (SHEPPARD *et al.*, 2008).

Dans le but de s'assurer que cette approche moléculaire pourrait être utilisée autant dans le domaine de la médecine que dans le domaine de la recherche, des isolats de *Campylobacter* d'origines diverses ont été inclus dans cette étude.

Matériels et méthodes

Souches de référence et isolats bactériens. *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, *Campylobacter coli* ATCC 49941, *Campylobacter lari* LSPQ 3218,

Campylobacter upsaliensis ATCC 49815 et *Campylobacter. fetus* LSPQ 2979 ont été utilisés comme souches de référence. Au total, 1956 isolats de *Campylobacter* ont été étudiés, soit 5 isolats prélevés de fèces de goélands sauvages (Oiseaux), 23 isolats de fèces de bovins (Bovin), 36 isolats de lait bovin cru (Lait cru) fournis par le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, 60 isolats de poulets frais achetés dans les épiceries de l'Estrie (Poulet), 301 isolats de cas humains symptomatiques (Humain) fournis par les laboratoires cliniques des hôpitaux de l'Estrie et 1531 isolats d'eau de l'Estrie (Eau), dont 2 isolats prélevés d'eau de puits pour consommation animale, 3 isolats prélevés d'eau de puits pour consommation humaine et 1526 isolats prélevés d'eau environnementale. Toutes les souches et tous les isolats ont été conservés à -80°C dans des tubes « Microbank » (Pro-Lab Diagnostics).

Tests biochimiques. Tous les isolats et toutes les souches ont été préalablement identifiés à l'espèce à l'aide des 6 tests biochimiques de routine préparés et interprétés selon les recommandations des fabricants et de MACFADDIN, 2000, MURRAY *et al.*, 2003 et LIOR, 1984. Pour ce faire, les souches et les isolats ont d'abord été cultivés sur une gélose TSA (Oxoid) et incubés dans une jarre « GasPak EZ » (BD Diagnostics) pendant 24 h à 42°C en micro-aérobie générée par des « GasPak EZ Campy Container System Sachets » (BD Diagnostics). Les souches de *C. upsaliensis* et *C. fetus* ont, quant à elles, été incubées à 37°C.

Oxydase. Une goutte de réactif d'oxydase (BD Diagnostics) a été déposée sur quelques colonies recueillies sur un écouvillon stérile. Le test était positif si les colonies devenaient violet foncé après un maximum de 10 sec.

Catalase. Une goutte de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 3% (Sigma-Aldrich) a été déposée sur une colonie transférée aseptiquement sur une lame de verre propre. Le test était positif s'il y avait production de bulles après un maximum de 30 sec.

Hydrolyse de l'indoxyle acétate. Un disque d'indoxyle acétate (Oxoid) légèrement humecté avec une petite goutte d'eau distillée stérile a été placé dans une boîte de pétri propre. Avec un embout stérile, plusieurs colonies ont été prélevées et étalées sur le disque humecté. Le test était positif s'il y avait apparition d'une couleur bleu ou bleu-vert sur le disque après une incubation de 20 min à découvert et à la température de la pièce.

Hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube. Une suspension laiteuse de colonies a été faite avec un écouvillon stérile dans 0,5 ml de solution d'hippurate de sodium à 1% stérile (Sigma-Aldrich). Après une incubation de 2 h à 37°C dans un bain, 5 gouttes de ninhydrine à 3,5% (EMD Biosciences) ont été ajoutées et le tout a été homogénéisé doucement. Après une seconde incubation de 10 min à 37°C dans un bain, le test était positif s'il y avait apparition d'une couleur violet foncé.

Résistance à l'acide nalidixique et à la céphalotine. Une suspension de colonies à une densité de 0,5 McFarland a été préparée dans 3 ml de bouillon Müeller-Hinton (Oxoid) stérile. À l'aide d'un écouvillon stérile, la suspension a été étalée sur une gélose TSA, puis, un disque d'acide nalidixique (30 µg) (Oxoid) et de céphalothine (30 µg) (Oxoid) ont été déposés sur la gélose. Après une incubation de

24 h à 42°C en micro-aérobie, une zone d'inhibition autour du disque indiquait la sensibilité à l'antibiotique.

Extraction d'ADN. Pour chaque souche et isolat, l'acide désoxyribonucléique (ADN) a été extrait d'une colonie isolée et cultivée sur gélose TSA pendant 24 h à 42°C en micro-aérobie ou à 37°C pour les souches de *C. upsaliensis* et de *C. fetus*. La colonie a été émulsionnée dans 25 µl de NaOH 0,5 N (Sigma-Aldrich) à l'aide d'un embout stérile et le tout a été incubé à la température de la pièce pendant 5 min. Ensuite, 25 µl de Tris 1 M pH 8,0 (EMD Biosciences) et 450 µl d'eau distillée stérile ont été ajoutés, puis le tout a été homogénéisé. L'ADN extrait a été conservé à -20°C.

Pour les isolats où il y avait divergence entre l'identification obtenue par les tests biochimiques et l'approche moléculaire, une extraction et une purification d'ADN supplémentaire ont été faites à l'aide de l'ensemble « DNeasy® Blood & Tissue » (Qiagen Group), selon les spécifications du fabricant (QIAGEN, 2006b). Brièvement, la colonie a été émulsionnée dans 180 µl de tampon ATL et mélangée à 20 µl de protéinase K fournie par le fabricant. Le tout a été incubé pendant 2 h à 56°C. Ensuite, 200 µl de tampon AL et 200 µl d'éthanol 96% ont été ajoutés et le tout a été transféré dans une colonne « DNeasy Mini spin » et centrifugé pendant 1 min à 8000 rpm (~ 6000 x g). Puis, 500 µl de tampon AW1 ont été ajoutés à la colonne et le tout a été centrifugé à nouveau pendant 1 min à 8000 rpm (~ 6000 x g). Ensuite, 500 µl de tampon AW2 ont été ajoutés et le tout a été centrifugé pendant 3 min à 13 000 rpm (~ 15 860 x g). Finalement, 400 µl de tampon AE ont été ajoutés à la colonne et l'ADN a été élué par centrifugation pendant 1 min à 8000 rpm (~ 6000 x g). Les extraits d'ADN ont été conservés à -20°C.

PCR hippurate. Cette PCR a été décrite par SLATER et OWEN, 1997. Les concentrations finales pour la réaction PCR, d'un volume final de 50 µl, étaient les suivantes : tampon 1X ; 0,4 µM de chacune des amorces Hip 1F (5'-GTA CTG CAA AAT TAG TGG CG-3') et Hip 2R (5'-GAG CTT TTA GCA AAC CTT CC-3') (Integrated DNA Technologies) ; 2,5 mM de MgCl₂ ; 0,2 mM de dNTP ; 1,25 U de « *Taq* DNA polymerase » ; 1 µl d'extrait d'ADN. Le programme PCR était le suivant : 1 x (1 min 30 sec à 94°C), 30 x (1 min à 94°C, 1 min à 56°C, 2 min à 72°C), 1 x (5 min à 72°C). Un produit PCR de 1151 pb était attendu. Dix microlitres des produits PCR hippurate ont subi une migration par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% pendant 75 min à 125 volts.

PCR-RFLP. Le développement de la PCR-RFLP a été inspiré des travaux de FERMER et ENGVALL, 1999 et de STEINHAUSEROVA *et al.*, 2001, mais ce sont les amorces 23SF et 23SR publiées par WANG *et al.*, 2002 qui ont été choisies, car elles étaient déjà utilisées dans le laboratoire pour la détection des *Campylobacter* spp. L'utilisation de *AluI* comme enzyme de restriction a été inspirée des travaux de FERMER et ENGVALL, 1999. Le site internet du « National Center for Biotechnology Information » (NCBI) a permis de vérifier théoriquement où se situaient les sites de coupures de *AluI* sur le gène de la sous-unité ribosomale 23S de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* et *C. fetus* disponible sur le site. Par la suite, sachant la taille théorique des fragments amplifiés par les amorces 23SF et 23SR ainsi que l'endroit des sites de coupure, il a été possible d'évaluer la taille des fragments digérés par *AluI* et d'anticiper les profils de digestion possibles pour chacune des 5

espèces de *Campylobacter* d'intérêt médical. De façon théorique, chacune de ces 5 espèces semblait donner un profil de digestion spécifique.

PCR 23S. Les concentrations finales pour la réaction PCR, d'un volume final de 50 µl, étaient les suivantes : tampon 1X ; 0,5 µM de chacune des amorces 23SF (5'-TAT ACC GGT AAG GAG TGC TGG AG-3') et 23SR (5'-ATC AAT TAA CCT TCG AGC ACC G-3') (Integrated DNA Technologies) ; 3 mM de MgCl₂ ; 0,2 mM de dNTP ; 1,25 U de « *Taq* DNA polymerase » ; 1 µl d'extrait d'ADN. Le programme PCR était le suivant : 1 x (1 min 30 sec à 94°C), 30 x (30 sec à 94°C, 30 sec à 59°C, 30 sec à 72°C), 1 x (5 min à 72°C). Un produit PCR de 651 pb était attendu. Dix microlitres des produits PCR 23S ont subi une migration par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% pendant 75 min à 125 volts.

RFLP. Les concentrations finales pour la réaction enzymatique, d'un volume final de 20 µl, étaient les suivantes : tampon NEB2 (New England Biolabs) 1X ; 5 U d'enzyme *AluI* (New England Biolabs) ; 10 µl de produits PCR 23S. Le tout a été homogénéisé et incubé dans un bain à 37°C pendant 3 h. Ensuite, 20 µl des produits de digestion enzymatique ont subi une migration par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% pendant 3 h à 125 volts.

PCR 16S. La PCR 16S a été décrite par LUBECK *et al.*, 2003. Les concentrations finales pour la réaction PCR, d'un volume final de 50 µl, étaient les suivantes : tampon 1X ; 0,24 µM d'amorces OT1559 (5'-CTG CTT AAC ACA AGT TGA GTA GG-3') (Integrated DNA Technologies) ; 0,22 µM d'amorce 18-1 (5'-TTC CTT AGG TAC CGT CAG AA-3') (Integrated DNA Technologies) ; 2 mM de

MgCl₂ ; 0,2 mM de dNTP ; 1 U de « *Taq* DNA polymerase » ; 1 µl d'extrait d'ADN. Le programme PCR était le suivant : 1 x (2 min à 94°C), 35 x (30 sec à 94°C, 15 sec à 58°C, 30 sec à 72°C), 1 x (4 min à 72°C). Un produit PCR de 287 pb était attendu. Dix microlitres des produits PCR 16S ont subi une migration par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% pendant 75 min à 125 volts.

PCR multiplexe. La PCR multiplexe décrite par WANG *et al.*, 2002 devait permettre la distinction entre *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* et *C. fetus*. Cependant, pour des raisons imprécises, l'application et la mise au point de cette PCR multiplexe dans notre laboratoire se sont révélées très peu efficaces et peu reproductibles et ce, notamment pour la détection de *C. upsaliensis* et *C. fetus*. Malgré tout, elle a été utilisée dans l'espoir d'obtenir quelques résultats et a été appliquée en triplicata pour s'assurer de la reproductibilité des résultats obtenus. Les concentrations finales pour la réaction PCR, d'un volume final de 50 µl, étaient les suivantes : tampon de réaction (Roche Diagnostics) 1X ; 1 µM de chacune des amorces CJF (5'-ACT TCT TTA TTG CTT GCT GC-3'), CJR (5'-GCC ACA ACA AGT AAA GAA GC-3'), CCF (5'-GTA AAA CCA AAG CTT ATC GTG-3'), CCR (5'-TCC AGC AAT GTG TGC AAT G-3'), CLF (5'-TAG AGA GAT AGC AAA AGA GA-3'), CLR (5'-TAC ACA TAA TAA TCC CAC CC-3'), CUF (5'-AAT TGA AAC TCT TGC TAT CC-3'), CUR (5'-TCA TAC ATT TTA CCC GAG CT-3'), CFF (5'-GCA AAT ATA AAT GTA AGC GGA GAG-3') et CFR (5'-TGC AGC GGC CCC ACC TAT-3') (Integrated DNA Technologies) ; 0,5 mM de MgCl₂ ; 0,2 mM de dNTP ; 1,25 U de « FastStart *Taq* DNA polymerase » (Roche Diagnostics) ; 1 µl d'extrait d'ADN. Le programme PCR était le suivant : 1 x (15 min à 95°C), 30 x (30 sec à 93°C, 30 sec à 59°C, 30 sec à 72°C), 1 x (7 min à 72°C). Un produit PCR de 126 pb était attendu pour *C. coli*, 204

pb pour *C. upsaliensis*, 251 pb pour *C. lari*, 323 pb pour *C. jejuni* et 435 pb pour *C. fetus*. Dix microlitres des produits PCR multiplexe ont subi une migration par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% pendant 75 min à 125 volts.

MLST. Les techniques de MLST utilisées dans cette étude ont été décrites par DINGLE *et al.*, 2001a (*C. jejuni*), MILLER *et al.*, 2005 (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis*), VAN BERGEN *et al.*, 2005 (*C. fetus*) et LEVESQUE *et al.*, 2008 (*C. jejuni*). Le MLST étant une technique très coûteuse, seuls 318 isolats de *Campylobacter* faisant partie de cette étude ont été soumis au MLST. Toutes les manipulations en lien avec le MLST ont été gracieusement faites par mon collègue Simon Lévesque.

Séquençage du gène de l'ARNr 16S. La PCR universelle, utilisée pour la détection et l'amplification d'une portion du gène de l'ARNr 16S, a été inspirée des travaux de DAMS *et al.*, 1988, NEEFS *et al.*, 1990, WILSON *et al.*, 1990 et GREISEN *et al.*, 1994. Ce sont ces produits de PCR universelle qui ont été séquencés. Le séquençage est une technique relativement coûteuse, ainsi, seuls 301 isolats de *Campylobacter* faisant partie de cette étude ont été soumis au séquençage d'une portion du gène de l'ARNr 16S. Les concentrations finales pour la réaction PCR, d'un volume final de 50 µl, étaient les suivantes : tampon 1X ; 1 µM d'amorces rRNA 795F (5'-ATT AGA TAC CCT DGT AGT CC-3') et rRNA 1551RBR (5'-GGT GAT CCA DCC RCA SGT TC-3') (Integrated DNA Technologies) ; 3 mM de MgCl₂ ; 0,2 mM de dNTP ; 1,25 U de « *Taq* DNA polymerase » ; 1 µl d'extrait d'ADN. Le programme PCR était le suivant : 1 x (1 min 30 sec à 94°C), 40 x (30 sec à 94°C, 30 sec à 55°C, 1 min à 72°C), 1 x (8 min à 72°C). Un produit PCR de 752 pb était attendu. Dix

microlitres des produits PCR universelle ont subi une migration par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% pendant 75 min à 125 volts. Puis, si l'amplification avait fonctionné, 5 µl de l'amorce rRNA 975R (5'-GCA ACG CGA AGA ACC TTA CC-3') (Integrated DNA Technologies) ayant une concentration finale de 20 µM et 5 µl de produits PCR universelle étaient envoyés au Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill à Montréal, Québec, Canada. Cette entreprise séquençait alors le fragment d'ADN amplifié à partir du site d'appariement de l'amorce rRNA 975R jusqu'au site d'appariement de l'amorce rRNA 1551RBR, ce qui permettait le séquençage d'un fragment d'environ 529 pb. Le résultat de séquençage pouvait ensuite être comparé avec une base de données internationale sur le site internet du « Basic Local Alignment Search Tool » (BLAST), afin de faire l'identification au genre et à l'espèce des isolats de *Campylobacter*.

Les réactions PCR ont été effectuées dans un thermocycleur « MBS 0,2G » (ThermoHybaid). À moins d'une spécification contraire, le tampon, le MgCl₂ et la « *Taq* DNA polymerase » utilisés dans les réactions PCR décrites précédemment ont été fournis par un service du département de microbiologie et d'infectiologie de la Faculté de médecine et des sciences de la santé du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada. Les gels de migration contenant les produits PCR ou les produits de digestion enzymatique ont été colorés avec du bromure d'éthidium (1 mg/l) pendant 30 min, puis les produits PCR ou les produits de digestion enzymatique ont été visualisés sous rayons ultraviolets (3,5 sec d'exposition) avec un appareil photo numérique « DC 290 Zoom Digital » (Kodak).

Résultats

C'est un total de 1950 isolats et 5 souches de *Campylobacter* qui ont été utilisés pour le développement de l'approche moléculaire d'identification à l'espèce du *Campylobacter*, car 6 isolats d'eau sont morts au cours du processus d'analyse.

Identification à l'espèce par les tests biochimiques. Les 5 souches de *Campylobacter* de référence ont été correctement identifiées à l'espèce par les tests biochimiques. Des 1950 isolats de *Campylobacter* utilisés dans l'étude, 1418 (72,7%) isolats ont été identifiés par les tests biochimiques comme étant du *C. jejuni*, 168 (8,6%) isolats comme étant du *C. coli*, 98 (5,0%) isolats comme étant du *C. lari*, 27 (1,4%) isolats comme étant du *C. fetus*, 5 (0,3%) isolats comme étant du *C. upsaliensis* et 234 (12,0%) isolats de *Campylobacter* n'ont pas pu être identifiés à l'espèce par les tests biochimiques, car les combinaisons de résultats obtenus avec les tests biochimiques ne concordaient pas avec les combinaisons attendues (Tableau 4) pour les 5 espèces de *Campylobacter* étudiées dans ce projet. Il est intéressant de noter que ces 234 isolats de *Campylobacter* spp. ont tous été prélevés dans l'eau.

Identification des *C. jejuni* par la PCR hippurate. Comme anticipé, sur les 5 souches de *Campylobacter* incluses dans l'étude, seule la souche *C. jejuni* ATCC 33560 a donné un résultat positif à la PCR hippurate. Sur les 1950 isolats de *Campylobacter* dont l'ADN a tout d'abord été extrait par la méthode au NaOH, 1525 isolats (78%) ont donné un résultat positif à la PCR hippurate et ont été identifiés comme étant *C. jejuni*. De l'autre côté, 425 isolats (22%) ont donné un résultat négatif à la PCR hippurate. Des 425 isolats, 184 (43%) ont subi une nouvelle extraction et une purification d'ADN avec l'ensemble « DNeasy® Blood & Tissue » de Qiagen. Ces

nouveaux extraits d'ADN purifiés ont été faits afin de s'assurer que le bon fonctionnement de la réaction PCR n'avait pas été entravé par un extrait d'ADN non-purifié, ce qui aurait pu occasionner des faux résultats négatifs. Ainsi, sur les 184 nouveaux extraits d'ADN, 85 isolats (46%) ont donné un résultat positif à la PCR hippurate et ont été identifiés comme étant *C. jejuni* et 99 isolats (54%) ont encore une fois donné un résultat négatif à la PCR hippurate. De ce fait, l'extraction et la purification de l'ADN par l'ensemble « DNeasy® Blood & Tissue » de Qiagen ont permis d'éviter d'obtenir des faux résultats négatifs pour 85/1950 (4%) isolats de *C. jejuni* testés par la PCR hippurate, dont 81 isolats ont été prélevés dans l'eau, 1 isolat a été prélevé dans du lait cru et 3 isolats ont été prélevés chez des cas humains. Étant donné ces résultats, les 241/425 isolats ayant donné un résultat négatif à la PCR hippurate restant devront également être soumis à une extraction et à une purification d'ADN par l'ensemble « DNeasy® Blood & Tissue » de Qiagen avant d'être de nouveau soumis à la PCR hippurate. En résumé, jusqu'à maintenant, un total de 1610/1950 (83%) isolats ont donné un résultat positif à la PCR hippurate et ont été identifiés comme étant *C. jejuni*.

La PCR-RFLP. Les 5 souches de référence ainsi que 1157/1950 (59%) isolats de *Campylobacter* ont été soumis à la PCR-RFLP, ce qui a résulté en l'observation de 14 profils de digestion facilement différenciables (Figure 8).

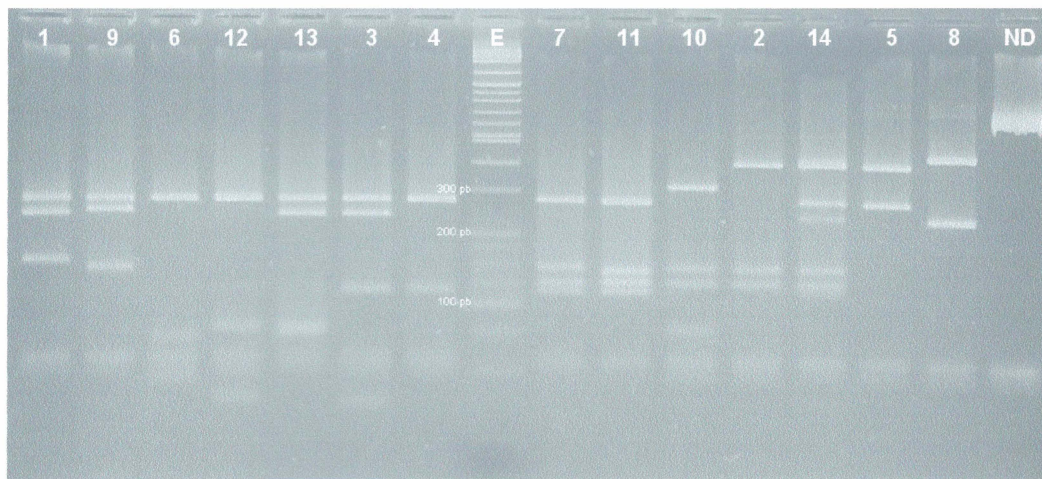


FIGURE 8. Visualisation des 14 profils de digestion de la PCR-RFLP sur gel d'agarose à 3%. Ces profils de digestion ont été obtenus via l'étude de 1162 isolats et souches de *Campylobacter*. 1 à 14. Profils de digestion. E. Échelle de poids moléculaire mixte de 25 et 100 pb. ND. Fragment d'ADN amplifié, mais non digéré par *AluI*.

Les numéros 1 à 14 ont été assignés arbitrairement à chacun des profils de digestion en fonction de leur ordre d'observation au cours de l'étude. Tous les profils de digestion sont reproductibles d'une PCR 23S et d'une digestion par *AluI* à l'autre. Il est important de noter que 774/1950 (40%) isolats de *C. jejuni* prélevés dans l'eau et ayant donné un résultat positif au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube et à la PCR hippurate ont été volontairement exclus des analyses par PCR-RFLP, étant donnée qu'il n'y avait pas d'ambiguïté possible dans l'identification et du fait que les *C. jejuni* étaient déjà très bien représentés dans les analyses par PCR-RFLP. Aucun produit de digestion n'a pu être visualisé sur gel d'agarose pour 18/1950 (0,9%) isolats prélevés dans l'eau et ayant été identifiés comme n'étant pas du *Campylobacter* par le séquençage du gène de l'ARNr 16S. Finalement, 1/1950 (0,1%) isolat, prélevé dans l'eau et ayant été identifié comme *C. lari* par le séquençage du gène de l'ARNr 16S, a produit un profil de digestion partiel qui était non-interprétable (les produits de digestion totalisaient 491 pb au lieu de 651 pb) et ce, malgré le fait qu'il a formé un produit de 651 pb au cours de la réaction de PCR 23S.

Association d'un profil de digestion à une espèce de Campylobacter.

L'identification à l'espèce des 5 souches de référence et des 1950 isolats de *Campylobacter* a tout d'abord été faite grâce aux tests biochimiques, à la PCR hippurate, à la PCR 16S, puis, si nécessaire à cause d'une ambiguïté, par le séquençage du gène de l'ARNr 16S, du MLST et/ou la PCR multiplexe et ce, afin de pouvoir associer une des 5 espèces de *Campylobacter* d'intérêt médical en particulier à chacun des 14 profils de digestion obtenus par la PCR-RFLP (Figure 8). Pour ce faire, les résultats obtenus pour les 5 souches de référence ont été associés à un profil de digestion en particulier (Tableau 5), puis les 1950 isolats de *Campylobacter* ont tout

d'abord été classés selon les résultats obtenus pour la PCR hippurate, puis selon les résultats obtenus pour le test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube (Figures 9 et 10) et ce, avant de les associer avec un profil de digestion en particulier.

Tel qu'attendu, parmi les 5 souches de référence, seule la souche *C. jejuni* ATCC 33560 a donné un résultat positif au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube et à la PCR hippurate (Tableau 5). Ensuite, tel qu'attendu, seules les souches *C. jejuni* ATCC 33560, *C. coli* ATCC 49941 et *C. lari* LSPQ 3218 ont donné un résultat positif à la PCR 16S. Finalement, chacune des 5 souches de référence a pu être associée à un profil de digestion par PCR-RFLP en particulier, à l'exception des souches *C. jejuni* ATCC 33560 et *C. coli* ATCC 49941 qui sont toutes les deux associées au profil de digestion 2.

TABEAU 5. Identification à l'espèce des 5 souches de *Campylobacter* en fonction des tests biochimiques, de la PCR hippurate, de la PCR 16S et de la PCR-RFLP.

Souches de référence ^a	PCR- RFLP ^b	Tests biochimiques ^c	PCR hippurate	PCR 16S
<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	2	<i>C. jejuni</i>	+	+
<i>C. coli</i> ATCC 49941	2	<i>C. coli</i>	-	+
<i>C. lari</i> LSPQ 3218	3	<i>C. lari</i>	-	+
<i>C. fetus</i> LSPQ 2979	8	<i>C. fetus</i>	-	-
<i>C. upsaliensis</i> ATCC 49815	9	<i>C. upsaliensis</i>	-	-

^aATCC : « American type culture collection ». LSPQ : Laboratoire de santé publique du Québec.

^bProfil de digestion obtenu par PCR-RFLP.

^cIdentification faite à l'aide des 6 tests biochimiques de routine (oxydase, catalase, hydrolyse de l'indoxyle acétate et de l'hippurate de sodium en tube, résistance à l'acide nalidixique et à la céphalotine).

Parmi les 1950 isolats de *Campylobacter* testés, 1610 (83%) ont donné un résultat positif à la PCR hippurate (Figure 9) et ont donc été identifiés comme étant *C. jejuni*. De ces 1610 isolats de *C. jejuni*, 1385 isolats (86%) ont également donné un résultat positif au test de l'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube et à la PCR 16S. De ces 1385 *C. jejuni*, 611 (44%) ont subi une PCR-RFLP et se sont regroupés dans les profils de digestion 2, 4, 5, 7, 10 et 12.

Deux cent vingt-cinq sur 1610 (14%) isolats de *C. jejuni*, ayant donné un résultat positif à la PCR hippurate et à la PCR 16S, ont donné un résultat négatif au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube et se sont regroupés dans les profils de digestion 1, 2, 4, 5, 6, 7, 12 et 13 (Figure 9).

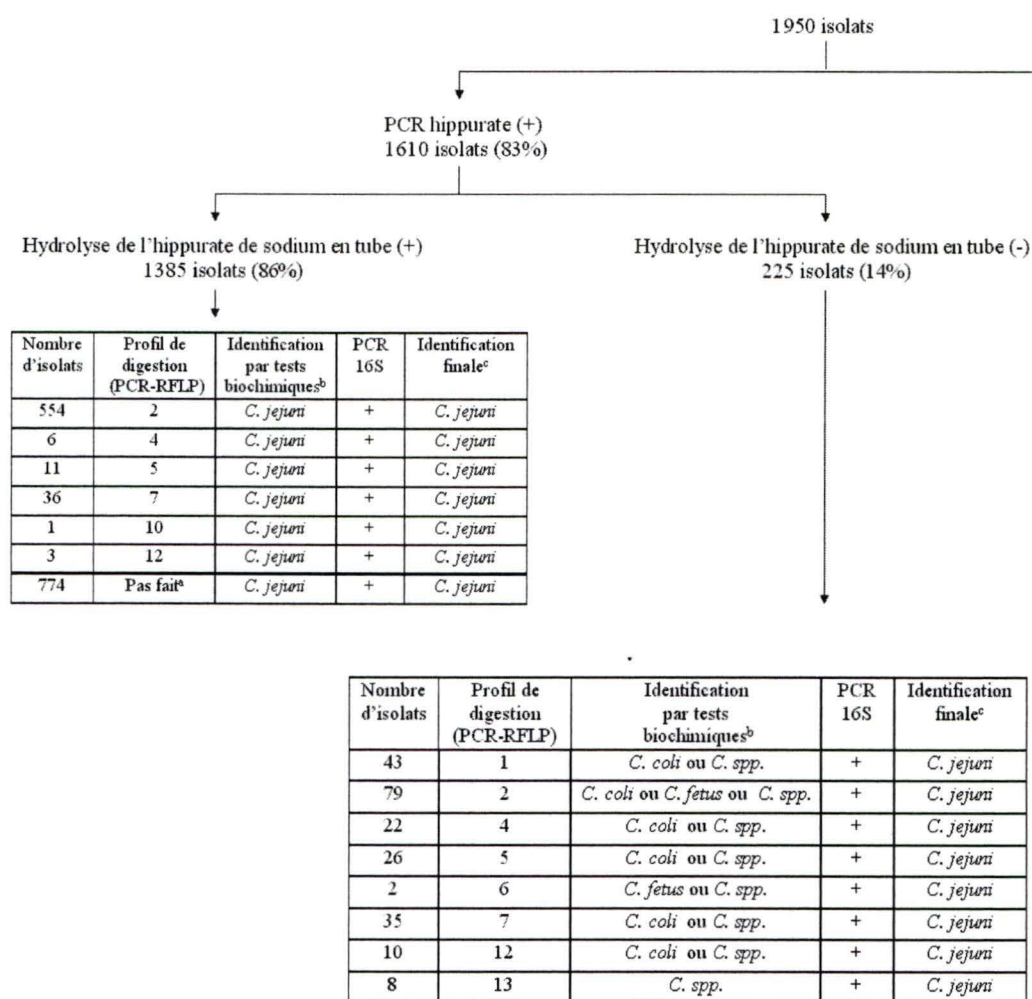


FIGURE 9. Association des isolats de *Campylobacter* donnant un résultat positif à la PCR hippurate avec un profil de digestion par PCR-RFLP. ^a. Ces isolats n'ont pas été soumis à la PCR-RFLP. ^b. Identification faite à l'aide des 6 tests biochimiques de routine. ^c. Identification faite selon les résultats obtenus avec les tests biochimiques, la PCR hippurate et la PCR 16S.

Parmi les 1950 isolats de *Campylobacter* testés, 340 (17%) ont donné un résultat négatif à la PCR hippurate (Figure 10). Trente-trois de ces isolats (10%) ont donné un résultat positif au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube et ce, de façon répétée. Vingt-huit isolats sur 33 (85%) ont donné un résultat positif à la PCR 16S, ont été identifiés comme étant du *C. lari* par le séquençage du gène de l'ARNr 16S, le MLST et/ou la PCR multiplexe et se sont regroupés dans le profil de digestion 3. Les 5/33 autres isolats (15%) ont donné un résultat négatif à la PCR 16S, ont été identifiés comme n'étant pas du *Campylobacter* par le séquençage du gène de l'ARNr 16S et n'ont pas donné de produit de digestion avec la PCR-RFLP.

Trois cent sept sur 340 isolats (90,0%), qui avaient aussi donné un résultat négatif à la PCR hippurate, ont donné un résultat négatif au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube (Figure 10). De ces 307 isolats, 293 (95,4%) se sont regroupés dans les profils de digestion 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13 et 14 et l'identification à l'espèce de certains d'entre eux a été validée par le séquençage du gène de l'ARNr 16S, le MLST et/ou la PCR multiplexe. Treize des ces 307 isolats (4,2%) ont donné un résultat négatif à la PCR 16S, n'ont pas donné de produits de digestion avec la PCR-RFLP et ont été identifiés comme n'étant pas du *Campylobacter* par le séquençage du gène de l'ARNr 16S. Finalement, 1/307 (0,3%) isolat, n'ayant pas pu être correctement identifié à l'espèce par les tests biochimiques, ayant donné un résultat positif à la PCR 16S et ayant été identifié comme étant *C. lari* par le séquençage du gène de l'ARNr 16S, n'a donné qu'un profil de digestion partiel, lequel n'a pas pu être associé à un profil de digestion.

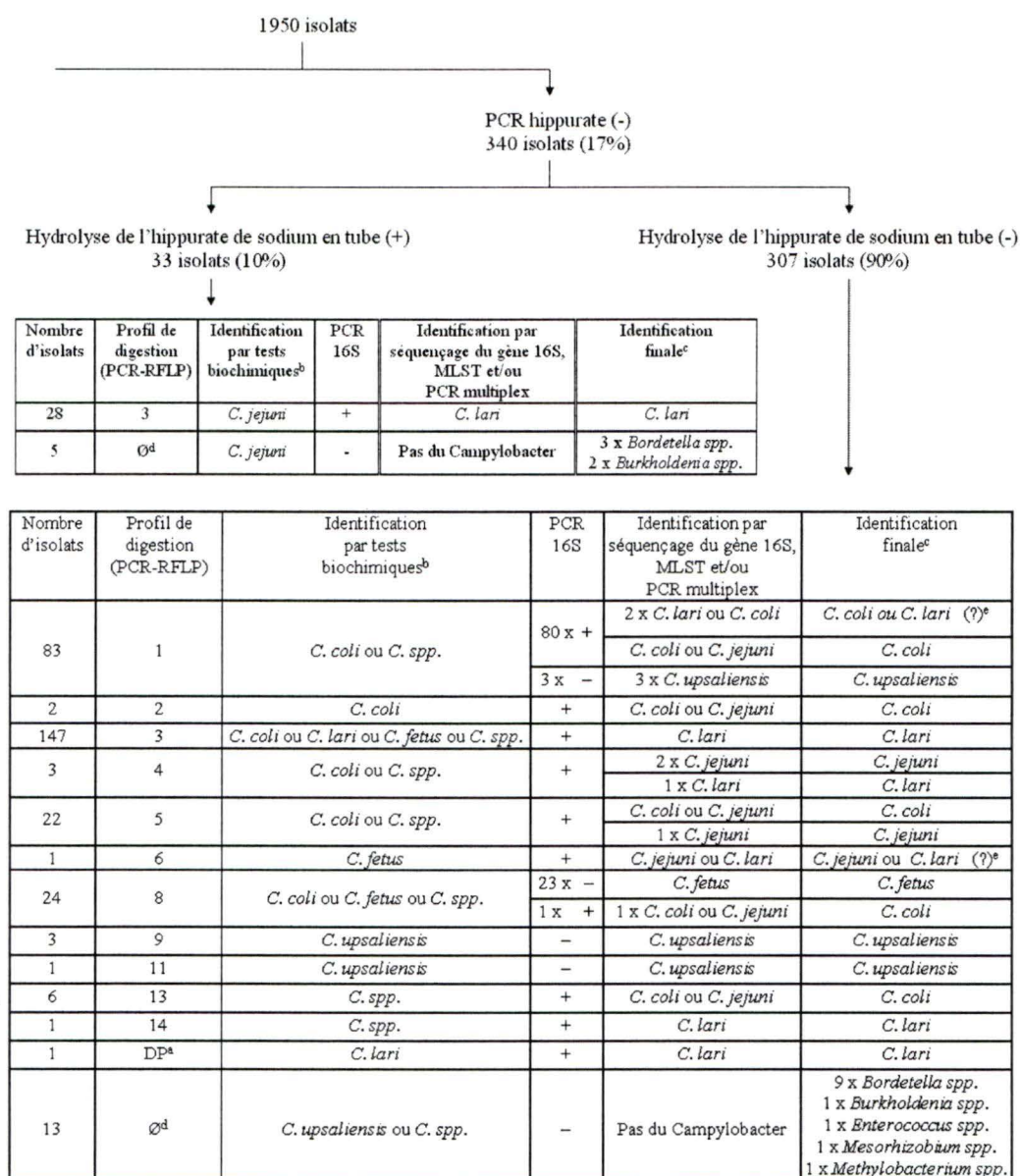


FIGURE 10. Association des isolats de Campylobacter donnant un résultat négatif à la PCR hippurate avec un profil de digestion par PCR-RFLP. ^a. Profil de digestion partiel et non-interprétable. ^b. Identification faite à l'aide des 6 tests biochimiques de routine. ^c. Identification faite selon les résultats obtenus avec les tests biochimiques, la PCR hippurate, la PCR 16S et, au besoin, le séquençage du gène de l'ARNr 16S, le MLST et/ou la PCR multiplexe. ^d. Ces isolats n'ont pas produit de profil de digestion par PCR-RFLP. ^e. Identification non définie avec tous les tests (biochimiques et moléculaires) utilisés dans cette étude.

Ainsi, la presque totalité des 1950 isolats de *Campylobacter* inclus dans l'étude a pu être identifié à l'espèce grâce à la PCR hippurate combinée à la PCR 16S et, dans certains cas, grâce à la validation faite par le séquençage du gène de l'ARNr 16S, le MLST et/ ou la PCR multiplexe. Avec ces informations, il a été possible d'associer au moins une espèce de *Campylobacter* à chacun des 14 profils de digestion obtenus par PCR-RFLP. Les détails de l'association entre chacune des 5 espèces de *Campylobacter* d'intérêt médical selon chacun des 14 profils de digestion et une brève description des isolats dont l'identification à l'espèce demeure confuse sont contenus dans le tableau 6.

Aucun isolat problématique n'a été observé pour les profils de digestion #2 et #7 à 14 (Tableau 6). L'identification à l'espèce de la plupart de ces isolats a été validée par le séquençage du gène de l'ARNr 16S, par le MLST et/ou par la PCR multiplexe.

Le profil de digestion #1 contient deux isolats d'eau dont l'identification à l'espèce est problématique. Les deux isolats étaient négatifs à la PCR hippurate, positifs à la PCR 16S, ont été identifiés comme étant *C. lari* par le MLST et ont été identifiés comme étant soit *C. jejuni* ou du *C. coli* par le séquençage du gène de l'ARNr 16S. Un des isolats a été identifié comme étant *C. coli* par les tests biochimiques et l'autre n'a pas pu être correctement identifié à l'espèce par les tests biochimiques (Figure 10). L'identification la plus plausible pour ces deux isolats d'eau semble être soit *C. coli*, soit *C. lari*.

TABEAU 6. Détails de l'identification à l'espèce des 1157 isolats et 5 souches de *Campylobacter* analysés seulement en fonction des 14 profils de digestion obtenus par PCR-RFLP.

Profil de digestion (PCR-RFLP)	Espèce correspondante	Nombre d'isolats correspondant à l'espèce	Source du prélèvement ^a	Souche de référence	Description des isolats problématiques ^b
1	<i>C. upsaliensis</i> <i>C. jejuni</i> <i>C. coli</i>	3/126 (2%) 43/126 (34%) 78/126 (62%)	2% Humain 98% Eau		2 isolats d'eau (<i>C. coli</i> ou <i>C. lari</i>)
2	<i>C. coli</i> <i>C. jejuni</i>	2/635 (0,3%) 633/635 (99,7%)	0,5% Bovin 5,7% Lait cru 8,7% Poulet 42,2% Eau 42,9% Humain	<i>C. coli</i> ATCC 49941 <i>C. jejuni</i> ATCC 33560	
3	<i>C. lari</i>	147/175 (84%)	0,6% Humain 2,3% Oiseaux 97,1% Eau	<i>C. lari</i> LSPQ 3218	28 isolats d'eau (<i>C. lari</i> hippurate en tube +)
4	<i>C. lari</i> <i>C. jejuni</i>	1/31 (3%) 28/31 (90%)	100% Eau		2 isolats d'eau (<i>C. jejuni</i> PCR hippurate -)
5	<i>C. coli</i> <i>C. jejuni</i>	21/59 (36%) 37/59 (63%)	8% Poulet 29% Humain 63% Eau		1 isolat d'eau (<i>C. jejuni</i> PCR hippurate -)
6	<i>C. jejuni</i>	2/3 (67%)	100% Eau		1 isolat d'eau (<i>C. jejuni</i> ou <i>C. lari</i>)
7	<i>C. jejuni</i>	71/71 (100%)	1% Oiseaux 99% Eau		
8	<i>C. fetus</i> <i>C. coli</i>	23/24 (96%) 1/24 (4%)	8% Eau 8% Humain 84% Bovin	<i>C. fetus</i> LSPQ 2979	
9	<i>C. upsaliensis</i>	3/3 (100%)	100% Humain	<i>C. upsaliensis</i> ATCC 49815	
10	<i>C. jejuni</i>	1/1 (100%)	100% Humain		
11	<i>C. upsaliensis</i>	1/1 (100%)	100% Humain		
12	<i>C. jejuni</i>	13/13 (100%)	100% Eau		
13	<i>C. coli</i> <i>C. jejuni</i>	6/14 (43%) 8/14 (57%)	100% Eau		
14	<i>C. lari</i>	1/1 (100%)	100% Eau		
TOTAL		1123		5	34

^a: Nature de la source où l'isolat a été prélevé.

^b: Isolats dont l'identification à l'espèce demeure problématique.

Le profil de digestion #3 contient 28 isolats, prélevés dans l'eau, dont l'identification à l'espèce est problématique. Ces 28 isolats ont été identifiés comme étant *C. jejuni* par les tests biochimiques, étaient positifs à la PCR 16S, mais étaient négatifs à la PCR hippurate. Ce sont les résultats obtenus avec le séquençage du gène de l'ARNr 16S, le MLST et/ou la PCR multiplexe qui permettraient d'identifier ces 28 isolats comme étant des *C. lari* vraisemblablement positifs au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube (Figure 10). De plus, ces 28 isolats d'eau sont tous sensible à l'acide nalidixique, ce qui signifie qu'il pourrait peut-être s'agir d'isolats de *C. lari* NASC.

Le profil de digestion #4 contient deux isolats, prélevés dans l'eau, dont l'identification à l'espèce est problématique. Un de ces isolats n'a pas pu être identifié à l'espèce par les tests biochimiques. L'autre isolat a été identifié comme étant *C. coli* par les tests biochimiques et le MLST n'a pas pu faire la distinction entre *C. jejuni* et *C. coli*. Ces 2 isolats étaient négatifs à la PCR hippurate, mais étaient positifs à la PCR 16S. C'est le séquençage du gène de l'ARNr 16S qui permettrait d'identifier ces 2 isolats comme étant des *C. jejuni* négatifs à la PCR hippurate (Figure 10).

Le profil de digestion #5 contient un isolat, prélevé dans l'eau, dont l'identification à l'espèce est problématique. L'isolat n'a pas pu être correctement identifié à l'espèce par les tests biochimiques, était négatif à la PCR hippurate, mais était positif à la PCR 16S. C'est le séquençage du gène de l'ARNr 16S qui permettrait d'identifier cet isolat comme étant un *C. jejuni* négatif à la PCR hippurate (Figure 10).

Le profil de digestion #6 contient un isolat, prélevé dans l'eau, dont l'identification à l'espèce est problématique. Cet isolat a été identifié comme étant *C. fetus* par les tests biochimiques, a été identifié comme étant *C. lari* par le MLST, a été identifié comme étant *C. jejuni* par le séquençage du gène de l'ARNr 16S, était négatif à la PCR hippurate et était positif à la PCR 16S (Figure 10). L'identification la plus plausible pour cet isolat semble être *C. lari*, cependant, le résultat du séquençage du gène de l'ARNr 16S laisse planer un doute.

Ainsi, pour tous les isolats problématiques contenus dans les profils de digestion #1 et #3 à 6, d'autres tests moléculaires plus poussés devront être entrepris afin de pouvoir bien identifier ces isolats d'eau, car il y a trop de divergence dans l'identification faite par chacune des méthodes moléculaires utilisées dans cette étude.

Identification à l'espèce par l'approche moléculaire (PCR hippurate, PCR 16S et PCR-RFLP). Les 5 souches de *Campylobacter* de référence ont été correctement identifiées à l'espèce par l'approche moléculaire. Des 1950 isolats de *Campylobacter* utilisés dans l'étude, 1610 (82,6%) isolats ont été identifiés par l'approche moléculaire comme étant du *C. jejuni*, 108 (5,5%) isolats comme étant du *C. coli*, 149 (7,6%) isolats comme étant du *C. lari*, 23 (1,2%) isolats comme étant du *C. fetus*, 7 (0,4%) isolats comme étant du *C. upsaliensis*, 34 (1,7%) isolats d'eau de *Campylobacter* n'ont pas pu être correctement identifiés à l'espèce par l'approche moléculaire, 18 (0,9%) isolats d'eau n'étaient pas du *Campylobacter* et 1 isolat d'eau de *C. lari* n'a produit qu'un profil de digestion non-interprétable (Tableau 6) (Figures 9 et 10). Tous les isolats humains ont été correctement identifiés par l'approche moléculaire.

Discussion et conclusion

Pour instaurer de meilleures techniques d'identification à l'espèce dans les laboratoires, il faut pouvoir suggérer des outils rapides, simples, efficaces, reproductibles, facile à standardiser, mais surtout peu dispendieux. L'approche moléculaire (PCR hippurate, PCR 16S et PCR-RFLP) décrite dans cette étude a entre autres été développée dans ce but. De plus, cette approche moléculaire a l'avantage de pouvoir être utilisée en partie ou en totalité, tout dépendamment des résultats obtenus, comme le démontre la figure 11. De ce fait, la flexibilité de l'approche moléculaire pourrait permettre d'obtenir une identification à l'espèce fiable dans un délai aussi court que 8 h, dans le cas d'un potentiel *C. jejuni* dont l'ADN doit être extrait à partir d'une culture pure à l'aide de l'ensemble « DNeasy® Blood & Tissue » de Qiagen, et ce, comparativement à un minimum de 24 h pour les tests biochimiques. Il faut garder en mémoire que 80 à 90% des cas humains de campylobactériose sont causés par *C. jejuni* (NACHAMKIN et BLASER, 2000).

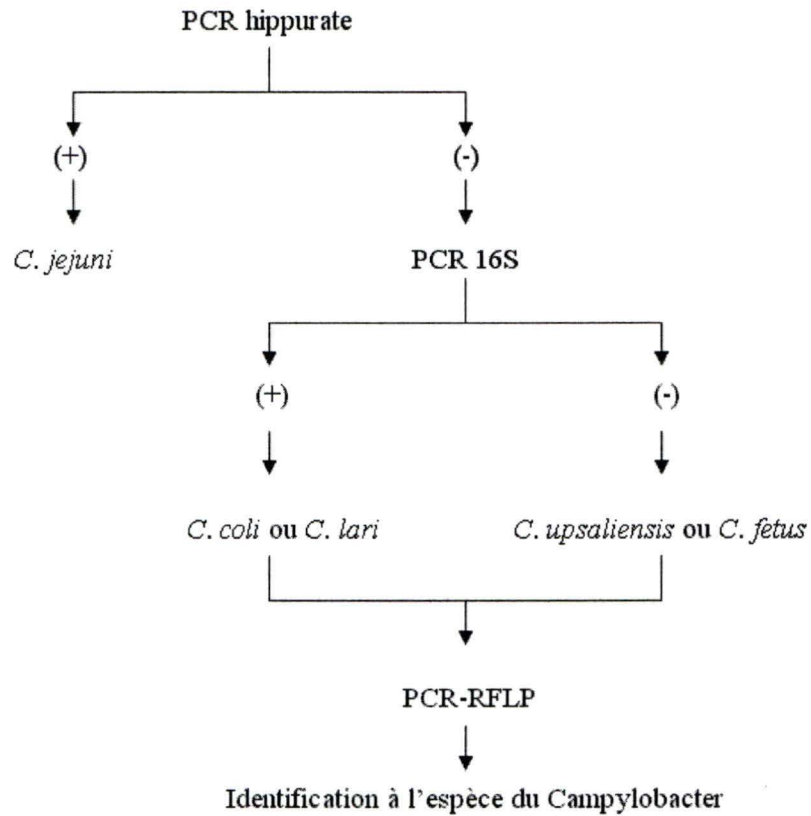


FIGURE 11. Algorithme décisionnel proposé pour l'identification à l'espèce des isolats de Campylobacter en fonction de l'approche moléculaire (PCR hippurate, PCR 16S et PCR-RFLP).

Ainsi, en comparant les résultats d'identification à l'espèce des isolats de *Campylobacter* obtenus par l'approche moléculaire versus ceux obtenus seulement avec l'utilisation des tests biochimiques de routine, il est possible de constater que, jusqu'à présent dans cette étude, l'approche moléculaire permettrait d'éviter la mauvaise identification à l'espèce de 508 isolats de *Campylobacter* et la mauvaise identification au genre de 18 isolats qui n'étaient pas du *Campylobacter*, ce qui ferait un total de 526/1950 isolats (27%) préalablement mal identifiés par les tests biochimiques seuls. Pour l'instant, l'approche moléculaire n'aurait toutefois pas pu identifier correctement à l'espèce 35/1950 isolats (1,8%) de *Campylobacter* (Tableau 6), dont 1/1950 isolat (0,05%) qui n'a donné qu'un profil de digestion partiel et non-interprétable. Très récemment, nous avons appris que la technique de séquençage du gène *cpn60*, décrite par HILL *et al.*, 2006, avait été suggérée, en 2008, par le « Clinical and Laboratory Standards Institute » (CLSI) (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008) pour l'identification à l'espèce du *Campylobacter*. Le gène *cpn60* possède des régions fonctionnelles conservées et des régions variables qui permettent une meilleure discrimination inter-espèces pour le genre *Campylobacter* et les séquences peuvent être comparées avec une base de données internationale. Cette technique a été recommandée par le CLSI pour compléter l'identification à l'espèce obtenue via le séquençage du gène de l'ARNr 16S, qui était jusqu'à maintenant la méthode de référence, car cette dernière méthode serait peu discriminante pour l'identification à l'espèce du *Campylobacter* en raison d'une faible variabilité génétique au niveau des gènes de l'ARNr 16S entre les espèces. Le gène de l'ARNr 16S de *C. jejuni* et de *C. coli* serait identique à 99,4% et le gène de l'ARNr 16S de certains *C. lari* atypiques serait aussi identique à celui de *C. jejuni* et de *C. coli* à 99,4%. De ces faits, les auteurs recommandent entre autres, avec l'analyse

du séquençage du gène de l'ARNr 16S, qu'il faut une homologie de $\geq 99\%$ pour faire une assignation à l'espèce et si l'homologie est de $\leq 95\%$, il n'est pas possible d'assigner un genre avec certitude. Ces récentes informations permettraient peut-être d'expliquer, du moins en partie, certains problèmes d'interprétation et d'identification obtenus avec l'utilisation du séquençage du gène de l'ARNr 16S dans cette étude. Ainsi, afin de confirmer l'identification à l'espèce des isolats de *Campylobacter* problématiques et des isolats autre que *C. jejuni* obtenue par le séquençage du gène de l'ARNr 16S et contenus dans cette étude, il est projeté d'utiliser la technique de séquençage du gène *cpn60* décrite par HILL *et al.*, 2006 et recommandée par le CLSI en 2008.

La principale force de l'approche moléculaire décrite dans cette étude se situe dans l'utilisation de la PCR hippurate, qui permet la détection du gène *hipO* spécifique à *C. jejuni* (SLATER et OWEN, 1997). Traditionnellement, c'est principalement avec le test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube que le *C. jejuni* est identifié à l'espèce (MACFADDIN, 2000), (MURRAY *et al.*, 2003) (LIOR, 1984). Selon LIOR 1984, pour que le test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube soit considéré comme positif, il faut voir apparaître une coloration violet foncé. Cependant, comme chaque laboratoire prépare et interprète ce test à sa façon et comme ce test est très subjectif, il peut être difficile à interpréter correctement pour une personne non-initiée (Figure 7), ce qui peut résulter en une mauvaise identification à l'espèce de l'isolat de *Campylobacter* (KODAKA *et al.*, 1982) (MORRIS *et al.*, 1985) (ON, 1996). Aussi, des réactions faussement positives pour des isolats de *Campylobacter* autres que *C. jejuni* ont déjà été rapportés par DENIS *et al.*, 1999 et l'étude décrite dans ce mémoire viendrait appuyer cet article avec l'observation de 28 isolats de *C. lari*

vraisemblablement positifs au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube. De plus, des *C. jejuni* donnant un résultat négatif au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube ont maintes fois été répertoriés dans la littérature (DENIS *et al.*, 1999) (NACHAMKIN et BLASER, 2000) (RONNER *et al.*, 2004) (SIEMER *et al.*, 2005) et l'étude décrite dans ce mémoire viendrait à nouveau appuyer ces données avec l'observation de 225/1950 (12%) isolats de *C. jejuni* ayant donné un résultat négatif à ce test biochimique, dont 215 ont été prélevés dans l'eau, 8 chez des cas humains et 2 de fèces de bovin. Récemment, une équipe a voulu trouver un moyen de « standardiser » l'interprétation de cet important test biochimique, afin de pouvoir diminuer le plus possible les probabilités d'interprétations erronées. Ainsi, l'équipe de NAKARI *et al.*, 2008, a conclu que pour éliminer toute probabilité de faux positifs ou de faux négatifs, il faut exécuter le test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube à partir d'une suspension bactérienne d'une densité comprise entre 6 et 10 McFarland et seule l'apparition d'une coloration violet foncé doit être considérée comme un résultat positif. Ainsi, la « standardisation » proposée dans l'étude de NAKARI *et al.*, 2008 a été appliquée sur les isolats problématiques contenus dans cette étude, à l'exception du fait que c'est une solution d'hippurate de sodium qui a été utilisée au lieu d'un disque. Cette approche a permis d'observer que 2 isolats d'eau et 1 isolat humain étaient en réalité négatifs à ce test et a permis de confirmer que les 28 isolats de *C. lari* vraisemblablement positifs au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube étaient bel et bien positifs à ce test. Peut-être s'agit-il d'une nouvelle sous-espèce de *C. lari* jamais observée auparavant ! Quoiqu'il en soit, d'autres tests devront être effectués sur ces 28 isolats, afin de valider leur identification à l'espèce.

L'utilisation de la PCR hippurate permettrait d'éviter ce genre d'ambiguïté. En effet, à elle seule, la PCR hippurate a permis d'identifier correctement 225/1950 (12%) isolats de *C. jejuni* donnant un résultat négatif au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube, de confirmer 1385/1950 (71%) isolats donnant un résultat positif au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube et aurait identifié les 28 isolats de *C. lari* vraisemblablement positifs au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube comme n'étant pas des *C. jejuni*.

Il faut cependant noter qu'au cours de cette étude, 4/1950 (0,2%) isolats d'eau ont donné un résultat négatif à la PCR hippurate, mais que 3 de ces isolats seraient identifiés, pour l'instant, comme étant *C. jejuni* par le séquençage du gène de l'ARNr 16S et qu'un de ces isolats serait identifié, pour l'instant, comme étant soit *C. jejuni* ou *C. lari* par le séquençage du gène de l'ARNr 16S ou le MLST (Tableau 6). L'identification précise de ces quatre isolats d'eau reste encore à être confirmée par le séquençage du gène *cpn60*, mais ce fait rappelle qu'il est possible que des *C. jejuni* atypiques (moins de 1%) donnent un résultat négatif à la PCR hippurate et ce, dû à une substitution de paire de bases ou à une délétion sur le site spécifique d'appariement des amorces de la PCR hippurate sur le gène *hipO* (SLATER et OWEN, 1997).

L'extraction et la purification de l'ADN par l'ensemble « DNeasy® Blood & Tissue » de Qiagen ont permis d'éviter d'obtenir des faux résultats négatifs pour 85/1950 (4%) isolats de *C. jejuni* testés par la PCR hippurate. Cette observation permet de constater qu'il semble important d'utiliser des extraits d'ADN purifiés, afin d'éviter toute inhibition ou dysfonctionnement de la réaction de PCR.

Finalement, cette étude se distingue particulièrement par la nature variée des sources de prélèvement et surtout le nombre important d'isolats analysés pour tester l'approche moléculaire. En effet, le nombre d'isolats et/ou de souches testés dans les autres études du même genre est généralement de moins de 165 (CARDARELLI-LEITE *et al.*, 1996) (LINTON *et al.*, 1997) (LINTON *et al.*, 1997) (FERMER et ENGVALL, 1999) (STEINHAUSEROVA *et al.*, 2001), contrairement à cette étude qui a testé près de 2000 isolats et souches. Ainsi, pour le moment, l'utilisation combinée de la PCR hippurate, de la PCR 16S et de la PCR-RFLP permettrait d'identifier correctement à l'espèce la majorité des isolats, peu importe la source d'où ils ont été prélevés, incluant tous les isolats humains dont l'identification précise à l'espèce est importante pour la documentation adéquate des cas de campylobactériose par la santé publique. Il est également intéressant de constater que 8/14 profils de digestion par PCR-RFLP semblent être associés à une seule espèce de *Campylobacter* en particulier (Tableau 6).

Il est important de comprendre que comme il n'y a aucune méthode unique qui est 100% efficace, il faut utiliser plus d'une méthode pour s'assurer de l'identification à l'espèce adéquate des isolats de *Campylobacter*. Aussi, l'identification à l'espèce du *Campylobacter* par la PCR-RFLP est passible d'être modifiée ou il est même possible que d'autres profils de digestion soient observés si des isolats prélevés, entre autres, de d'autres sources que celles étudiées dans ce mémoire sont testées et si des isolats de *Campylobacter* atypiques sont rencontrés. De plus, la confirmation de l'identification à l'espèce des 35 isolats problématiques et des isolats autres que *C. jejuni* par le séquençage du gène *cpn60* pourront peut-être modifier certains profils de digestion décrits dans cette étude quant à l'espèce de *Campylobacter* qui peut y être associée.

C'est pourquoi la combinaison de la PCR hippurate, de la PCR 16S et de la PCR-RFLP est si importante, car chaque composante de l'approche moléculaire permet d'appuyer les résultats obtenus par une autre composante. Quoi qu'il en soit, l'approche moléculaire demeurerait une solution pratique, simple, rapide et surtout peu dispendieuse pour permettre d'améliorer l'identification à l'espèce du *Campylobacter*.

Perspectives

Il sera nécessaire de confirmer l'identification des isolats de *Campylobacter* autres que *C. jejuni* et de finaliser l'identification des 35 isolats de *Campylobacter* dont l'identification à l'espèce précise n'a pas pu être réalisée avec les méthodes décrites dans cette étude. Tous les espoirs sont principalement dirigés vers la technique de séquençage du gène *cpn60* du *Campylobacter* décrite par HILL *et al.*, 2006 et suggérée par le « Clinical and Laboratory Standards Institute » (CLSI) (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008) pour faire l'identification à l'espèce de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* et *C. fetus*. Cependant, dans le cas où le séquençage du gène *cpn60* ne permettrait pas l'identification adéquate de certains isolats, l'utilisation d'une sonde à ADN spécifique permettant la détection ciblée du gène *hipO* unique à *C. jejuni* décrite par HANI et CHAN, 1995 pourrait être une solution envisageable afin de faire la distinction entre *C. jejuni* et les autres espèces de *Campylobacter*. Ensuite, l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) décrite par POPPERT *et al.*, 2008 pourrait aussi être une solution prometteuse qui permettrait de faire la distinction entre *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*. Troisièmement, une nouvelle PCR multiplexe, basée sur la détection du gène de la toxine de dilatation cytotytique *cdt*, récemment publiée par ASAKURA *et al.*, 2008 pourrait être envisagée pour permettre la distinction entre *C. jejuni* et *C. coli*.

Aussi, si les 28 isolats de *C. lari* vraisemblablement positifs au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube sont bel et bien identifiés comme étant des *C. lari* par le séquençage du gène *cpn60*, il sera très intéressant de faire une étude taxonomique en profondeur, comme il a été fait pour l'identification de la 19^e espèce de *Campylobacter* (*Campylobacter canadensis*) récemment découverte au Canada (INGLIS *et al.*, 2007), car il s'agirait peut-être d'une nouvelle sous-espèce de *C. lari* jamais observée auparavant.

Finalement, il sera nécessaire de faire une nouvelle extraction et purification d'ADN des 241/425 isolats ayant donné un résultat négatif à la PCR hippurate avec l'ensemble « DNeasy® Blood & Tissue » de Qiagen, afin de pouvoir les soumettre à nouveau à la PCR hippurate.

CHAPITRE 3

DÉVELOPPEMENT D'UNE PCR EN TEMPS RÉEL SEMI-QUANTITATIVE POUR *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, *CAMPYLOBACTER COLI* ET *CAMPYLOBACTER LARI* DANS L'EAU

Introduction

La présence du *Campylobacter* dans l'eau environnementale et dans l'eau de consommation non-traitée est bien documentée (CLARK *et al.*, 2003) (HORMAN *et al.*, 2004) (SCHUSTER *et al.*, 2005) (ABULREESH *et al.*, 2006) (ST-PIERRE *et al.*, soumis pour publication). De plus, la consommation d'une seule cellule de *Campylobacter* peut être un facteur de risque important pour la santé humaine (ROSE et GERBA, 1991) (TEUNIS *et al.* 2005). Ainsi, non seulement la détection, mais également la quantification du *Campylobacter* dans l'eau s'avèreraient avantageux, que ce soit pour permettre aux futures études épidémiologiques de bien cerner l'origine d'une épidémie à *Campylobacter*, évaluer l'impact de la charge bactérienne sur la santé humaine, animale et environnementale ou pour évaluer le risque associé à la consommation d'eau non-traitée ou à l'utilisation de l'eau à des fins récréatives.

Une méthode qui est fréquemment utilisée pour la quantification des microorganismes est la méthode du MPN, qui allie méthodes de culture traditionnelles et calculs statistiques (GONZÁLEZ, 1996) (DE MARTINIS *et al.*, 2007). L'utilisation de cette méthode pour la quantification est, dans certains cas, plus avantageuse que la

méthode d'étalement sur pétri (GONZÁLEZ, 1996). Par exemple, dans le cas du *Campylobacter*, le dénombrement direct sur une membrane filtrante, tel qu'utilisé pour le dénombrement des coliformes thermotolérants (CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, 2005), n'est pas possible. En effet, le *Campylobacter* est trop fragile, comparativement aux autres bactéries, et nécessite, entre autres, des conditions de croissance qui ne permettent pas d'inhiber la croissance de certains microorganismes retrouvés dans l'eau, ce qui rend presque impossible la croissance et le dénombrement des colonies de *Campylobacter* directement sur la membrane. Par conséquent, la méthode MPN est actuellement la méthode de choix pour la quantification du *Campylobacter* dans l'eau.

La méthode MPN consiste à faire plusieurs dilutions d'un échantillon mère, qui seront par la suite cultivées dans un milieu de culture approprié pour la croissance du microorganisme recherché. Ensuite, le nombre de dilutions dans lequel le microorganisme d'intérêt aura été détecté permettra d'évaluer la quantité la plus probable de ce microorganisme dans l'échantillon mère. Cette quantification est interprétable grâce à l'utilisation d'une table, basée sur des calculs statistiques et de probabilités, regroupant les valeurs quantitatives de MPN possibles pour un nombre de dilutions donné et ce, avec des intervalles de confiance inférieurs et supérieurs à 95%. La sensibilité et l'exactitude de la méthode MPN augmentent avec le nombre de dilutions utilisées (GONZÁLEZ, 1996).

La quantification du *Campylobacter* par la méthode MPN comporte cependant plusieurs lacunes. En effet, cette méthode est fastidieuse autant au niveau de la charge que de l'organisation du travail, qui dépendent intégralement du nombre de dilutions

utilisées. En guise d'exemple, en utilisant 5 dilutions pour quantifier le *Campylobacter* lors de l'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrie, l'obtention d'un résultat quantitatif confirmé par les tests biochimiques standardisés nécessitait un minimum de 8 jours de travail, ce qui est trop long, surtout lorsqu'il s'agit de prévention. De plus, cette méthode est peu précise, comme en attestent, entre autres, les grands intervalles de confiance qui entourent chacune des valeurs de MPN (Table 2) et ce, en plus d'être basée sur des calculs statistiques et de probabilités qui ne tiennent pas compte des possibles erreurs techniques et des limites de la méthode (ex : faux négatifs dus à l'inhibition ou la mort du *Campylobacter* par d'autres microorganismes ou par des substances toxiques). Troisièmement, chaque table de MPN est conçue spécifiquement pour une combinaison de dilutions précise, ce qui implique qu'il faut utiliser une table de MPN différente pour chaque étude où la combinaison utilisée de dilutions diffère l'une de l'autre. Par conséquent, une telle méthode serait difficile à instaurer dans les laboratoires accrédités d'analyses d'eau, advenant la nécessité de faire la détection et la quantification du *Campylobacter* dans l'eau de consommation et récréative à des fins préventives.

La technologie de la PCR en temps réel (RT-PCR) semble être toute désignée pour la quantification du *Campylobacter* dans l'eau, car elle présente plusieurs avantages en comparaison avec la méthode MPN qui utilise la culture traditionnelle. Premièrement, elle apporte un gain de temps considérable, car habituellement 1 à 2 jours de travail suffisent pour dénombrer le *Campylobacter* avec la RT-PCR, contre plusieurs jours pour la méthode MPN. De plus, la RT-PCR est une méthode plus sensible, car elle cible l'ADN et peut donc détecter et quantifier autant les cellules de

Campylobacter viables et cultivables que les cellules mortes ou non cultivables. En plus, la RT-PCR peut détecter de l'ADN contenu dans aussi peu qu'une seule cellule bactérienne (VOET et VOET, 1998). La RT-PCR est également plus spécifique que la méthode MPN, puisque même si le Campylobacter est en présence d'une microflore abondante et diversifiée dans un échantillon donné, la RT-PCR est capable de permettre l'identification et la quantification spécifique du Campylobacter contenu dans l'échantillon. De plus, la RT-PCR est plus précise, car la quantification est réalisée à partir d'un signal de fluorescence émis qui est proportionnel au nombre de copies du fragment d'ADN cible présent, plutôt que sur des calculs statistiques et de probabilités (KUBISTA *et al.*, 2006). Finalement, c'est une technologie de plus en plus accessible et de plus en plus utilisée, notamment dans les laboratoires cliniques des hôpitaux, dans les laboratoires de recherche et dans les laboratoires de santé publique (VOET et VOET, 1998) (KUBISTA *et al.*, 2006) (LEGOFF *et al.*, 2006).

Le principe général de la RT-PCR est sensiblement le même que celui de la PCR conventionnelle. L'innovation, au niveau de la RT-PCR, réside dans l'utilisation de fluorophores pour détecter et quantifier, en temps réel, les amplicons formés après chaque cycle d'amplification au cours de la réaction de RT-PCR, ce qui permet un gain de temps considérable étant donné que l'étape de visualisation des produits de la PCR sur gel d'agarose n'est plus nécessaire (POITRAS et HOUDE, 2002) (TSE et CAPEAU, 2003).

Lors d'une réaction d'amplification de RT-PCR, le cycle seuil (Ct) est le premier cycle où le signal de fluorescence émis est statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond pour un échantillon donné. Il représente la quantité

produite d'amplicons en un point précis au cours de la réaction de RT-PCR et c'est à partir de ce point que la quantification par RT-PCR peut être faite. Plus le nombre de copies du fragment d'ADN cible est élevé au début de la réaction de RT-PCR, moins élevé sera le nombre de cycle requis pour atteindre un Ct où le signal de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond (POITRAS et HOUDE, 2002) (TSE et CAPEAU, 2003) (WONG et MEDRANO, 2005) (KUBISTA *et al.*, 2006) (QIAGEN, 2006a).

Afin de pouvoir convertir ou interpréter le Ct d'un échantillon inconnu en nombre de copies du fragment d'ADN cible, l'utilisation d'une courbe standard mettant en relation le Ct en fonction du nombre de copies du fragment d'ADN cible est nécessaire. Pour bâtir une courbe standard, il suffit de préparer des échantillons étalons qui ont un nombre de copies du fragment d'ADN cible connu. Habituellement, des quantités d'ADN cible différentes d'un facteur de 10 et de l'ordre de 10^0 à 10^8 copies du fragment d'ADN cible sont utilisées. Les étalons sont par la suite soumis à la RT-PCR, en triplicata, afin de vérifier la reproductibilité des résultats. Pour qu'une RT-PCR soit considérée comme reproductible, la différence entre les trois valeurs de Ct obtenus pour un même étalon au cours de trois réactions de RT-PCR différentes ne doit pas dépasser 0,5. Sachant qu'un Ct donné correspond à un étalon d'ADN précis, l'expression du nombre de copies du fragment d'ADN cible de chacun des étalons sous forme logarithmique permet d'obtenir une relation linéaire entre le Ct et le nombre de copies du fragment d'ADN cible, ce qui engendre la courbe standard (Figure 12) (WONG et MEDRANO, 2005) (QIAGEN, 2006a).

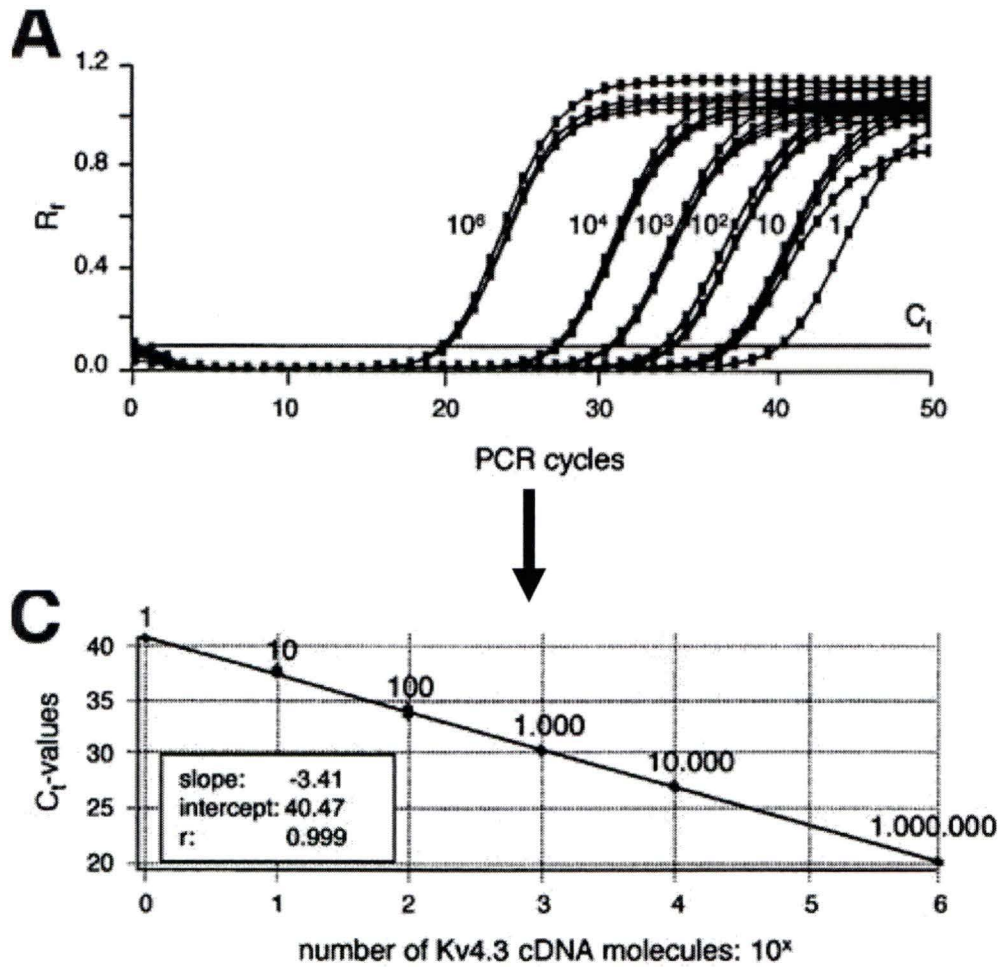


FIGURE 12. Création d'une courbe standard permettant de convertir un C_t en nombre de copies d'un fragment d'ADN cible. **A.** Courbes d'amplification de 6 étalons, représentant un nombre de copies d'un fragment d'ADN cible précis, mettant en relation le signal de fluorescence émis (R_t) et le nombre de cycles d'amplification au cours d'une réaction de RT-PCR. Chacun des 6 étalons produit son C_t correspondant. **C.** Courbe standard du C_t en fonction du logarithme du nombre de copies d'un fragment d'ADN cible. (LISS *et al.*, 2001)

La formule résultante de cette relation linéaire est exprimée comme suit : $C_t = a \log_{10}(Q_{DNA}) + b$, où C_t est le cycle seuil ; a est la pente de la droite ; (Q_{DNA}) est le nombre de copies du fragment d'ADN cible contenu dans la réaction de RT-PCR ; b est l'ordonnée à l'origine. Ainsi, la courbe standard permettra de traduire le C_t d'un échantillon inconnu en nombre de copies du fragment d'ADN cible correspondant et ce, en fonction des C_t obtenus pour les étalons. Afin de s'assurer que la conversion du C_t d'un échantillon inconnu en nombre de copies du fragment d'ADN cible à partir de la courbe standard se rapproche le plus possible d'une valeur réelle, le degré de correspondance (R^2) entre ces deux valeurs doit être calculé. Le degré de correspondance est une évaluation de la force de correspondance entre une valeur estimée et une valeur réelle. Étant donné que la courbe standard est généralement bâtie à partir des résultats de seulement 5 à 7 étalons, la droite tracée à partir de ces résultats représente une estimation des valeurs réelles contenues entre les résultats des 5 à 7 étalons. Ainsi, plus le R^2 de la courbe standard se rapprochera de 1, plus le degré de correspondance sera fort. Aussi, la pente d'une courbe standard donne une indication de l'efficacité et de la validité d'une RT-PCR. En effet, son efficacité peut être calculée avec l'équation $E = 10^{-1/S} - 1$, où E est l'efficacité ; S est la pente de la courbe standard. Pour qu'une RT-PCR soit efficace à 100%, il faut que le nombre d'amplicons double au cours de chaque cycle d'amplification de la phase exponentielle quantifiable de la réaction de RT-PCR. Ainsi, une telle RT-PCR aura un $E = 1$ (100%) et la pente de la courbe standard sera de -3,32. Étant donné les limites et variations expérimentales possibles, une RT-PCR ayant une efficacité entre 0,90 (90%) et 1,05 (105%) est considérée comme efficace (CROTTY *et al.*, 1994) (WONG et MEDRANO, 2005) (KUBISTA *et al.*, 2006) (LOVE *et al.*, 2006) (QIAGEN, 2006a).

Présentement, il existe 2 types de RT-PCR permettant la détection et la quantification d'ADN en temps réel via l'utilisation de fluorophores. Le premier utilise des agents intercalant qui se lient directement à l'ADN double brin (ADN db), comme le SYBR Green I et le Hoeschst 33258, par exemple. Le deuxième type est basé sur l'utilisation de sondes fluorescentes s'hybridant à un endroit précis sur la molécule d'ADN, ce qui permet d'obtenir une RT-PCR beaucoup plus spécifique. Présentement, il existe 4 technologies principales utilisant les sondes fluorescentes, c'est-à-dire la « TaqMan », le « Molecular Beacons », le « Scorpions primers » et l'hybridation de 2 sondes. Le concept de l'hybridation de 2 sondes utilise le principe de « fluorescence resonance energy transfer » (FRET) et repose sur l'utilisation de deux amorces et de deux sondes linéaires complémentaires à une séquence spécifique sur la molécule d'ADN cible. (VOET et VOET, 1998) (POITRAS et HOUDE, 2002) (KUBISTA *et al.*, 2006) (QIAGEN, 2006a). Un des avantages de l'utilisation des sondes fluorescentes dans une RT-PCR est qu'elles sont beaucoup plus sensibles qu'une RT-PCR utilisant des agents intercalant se liant à l'ADN db. En effet, à cause notamment des dimères d'amorces (primers dimers) et des produits non spécifiques, les agents se liant à l'ADN db, comme le SYBR Green I par exemple, peuvent généralement permettre à la RT-PCR d'atteindre une limite inférieure de détection d'environ 100 copies du fragment d'ADN cible par réaction de RT-PCR, tandis qu'avec les sondes fluorescentes, la RT-PCR peut atteindre un limite inférieur de détection pouvant aller jusqu'à 1 copie du fragment d'ADN cible par réaction de RT-PCR. Pour obtenir le même résultat avec le SYBR Green I par exemple, il faut utiliser des conditions PCR très strictes et une « Taq DNA polymerase » très performante pour pouvoir atteindre une limite de détection de moins de 10 copies du fragment d'ADN

cible (STONNET et GUESDON, 1993) (MORRISON *et al.*, 1998) (SAILS *et al.*, 2003) (TSE et CAPEAU, 2003) (YANG *et al.*, 2003) (YANG *et al.*, 2004).

Dans la littérature, rares sont les protocoles de RT-PCR qui permettent la détection et la quantification de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*, les 3 espèces de *Campylobacter* les plus importantes au niveau de la santé publique et les plus fréquemment retrouvées lors de l'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrée. Aussi, la majorité des études qui ont combiné analyse du *Campylobacter* et technologie de la RT-PCR, s'est servie de la RT-PCR uniquement comme outil de détection plutôt que comme outil de quantification, comme dans les études de SAILS *et al.*, 2003, PERELLE *et al.*, 2004, KRAUSE *et al.*, 2006 et HEIJNEN et MEDEMA, 2006, par exemple. Il existe toutefois quelques protocoles de RT-PCR quantitative, mais ces protocoles ne se basent pas sur une extrapolation faite à partir d'un enrichissement (KINDAICHI *et al.*, 2006) (TSUSHIMA *et al.*, 2007) (MORIO *et al.*, 2008) ou encore, ils ont été principalement conçus pour l'analyse de petits volumes d'échantillons de bouillon de poulet contenant une quantité initiale de *Campylobacter* élevée (SKANSENG *et al.*, 2006) (WOLFFS *et al.*, 2007). Cette quantité initiale importante de bactéries fait en sorte que la quantification par RT-PCR ne nécessite pas d'étape d'enrichissement préalable afin de s'assurer d'avoir un nombre suffisant de bactéries pour maximiser les chances de détection et également pour ne pas être en dessous de la limite inférieure de détection de la RT-PCR.

L'enrichissement est une étape précédant la RT-PCR qui permet d'augmenter significativement le nombre de cellules contenues dans un échantillon et ce, via la

culture dans des conditions favorisant la division cellulaire. L'enrichissement permet également d'obtenir des échantillons bactériens plus propres en diluant les substances qui pourraient perturber ou nuire à la réaction de RT-PCR. Bien qu'une RT-PCR utilisant des sondes fluorescentes puisse atteindre une limite de détection inférieure pouvant aller jusqu'à 1 copie du fragment d'ADN cible par réaction de RT-PCR avec l'utilisation d'un standard provenant d'une culture pure, cette limite inférieure peut augmenter à 6 ou 15 copies du fragment d'ADN cible par réaction de RT-PCR avec l'utilisation d'échantillons naturellement contaminés (YANG *et al.*, 2003). Malgré que de grandes quantités (110 à 1100 MPN/L) de *Campylobacter* aient pu être observées dans l'eau, cette bactérie est généralement retrouvée en faible quantité (moins de 50 MPN/L) (SAVILL *et al.*, 2001) (TILL *et al.*, 2008) (ST-PIERRE *et al.*, soumis pour publication), ce qui implique qu'il serait nécessaire d'analyser et/ou de concentrer de grands volumes d'eau afin de pouvoir détecter le *Campylobacter* avec une RT-PCR. L'équipe de MORENO *et al.*, 2003 a comparé la limite inférieure de détection d'une PCR conventionnelle avec des échantillons d'eau (300 ml) naturellement contaminés selon qu'ils aient subi ou non une étape d'enrichissement. Cette équipe a observé que l'étape d'enrichissement a permis de diminuer la limite inférieure de détection de la PCR conventionnelle d'un facteur de 10, passant d'une limite inférieure de 10^2 sans étape d'enrichissement à 10^1 avec une étape d'enrichissement. De ce fait, l'enrichissement s'avèrerait avantageux, car il permettrait de concentrer et d'augmenter le nombre initial de bactéries afin de maximiser les chances de détection et de quantification du *Campylobacter* de façon reproductible.

De tous ces faits et connaissances et aussi des difficultés qu'a entraînées la quantification du *Campylobacter* par la méthode MPN lors de l'étude de prévalence et

de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrée, est né un projet audacieux. Il s'agissait de vérifier s'il serait possible de développer un protocole simple, rapide et surtout reproductible qui permettrait d'extrapoler la quantité de *Campylobacter* initiale contenue dans des échantillons d'eau naturellement contaminés via une quantification par RT-PCR qui elle-même est précédée d'un enrichissement et ce, tout en étant spécifique pour les 3 principales espèces de *Campylobacter* d'intérêt médical ayant été observées dans l'eau. Ce protocole devait également être facile à standardiser et à implanter dans les laboratoires d'analyses d'eau accrédités, advenant la nécessité de faire la détection et la quantification du *Campylobacter* dans l'eau de consommation et récréative à des fins préventives. Ce projet était audacieux en ce sens où, selon mes connaissances, aucune expérience quantitative du genre sur le *Campylobacter* n'a été publiée jusqu'à maintenant. L'hypothèse était qu'il serait intéressant de faire multiplier le nombre initial de cellules de *Campylobacter* par un facteur constant afin de pouvoir ensuite les quantifier de façon reproductible. Comme le protocole de détection et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrée par la méthode MPN utilisait déjà une étape d'enrichissement et que l'efficacité de ce protocole avait déjà été éprouvée, il semblait intéressant que cette étape d'enrichissement puisse devenir un prélude à la quantification par RT-PCR. Afin de pouvoir inclure l'étape d'enrichissement dans un éventuel protocole de quantification par RT-PCR, il fallait que cette étape d'enrichissement permette la multiplication des cellules de *Campylobacter* par un facteur constant, c'est-à-dire que les cellules de *Campylobacter* devaient pouvoir se diviser à une vitesse égale et que la période de latence devait être identique ou proportionnelle à la quantité initiale de cellules de *Campylobacter*. Même en démontrant *in vitro* la reproductibilité du temps de

génération et de la phase de latence des cellules de *Campylobacter* au cours d'une étape d'enrichissement, il serait impossible de prétendre qu'elles seront toujours parfaitement identiques, le protocole de quantification par RT-PCR serait donc considéré comme semi-quantitatif plutôt que quantitatif.

Ainsi, étant donné les désavantages et/ou les lacunes des protocoles de quantification par RT-PCR déjà publiés et partant du principe qu'il est nécessaire d'effectuer l'enrichissement d'un grand volume d'échantillon d'eau (ST-PIERRE *et al.*, soumis pour publication) contenant vraisemblablement une faible quantité initiale de *Campylobacter* avant la quantification par RT-PCR, ce projet visait à vérifier s'il serait possible de développer un protocole de RT-PCR semi-quantitative (qRT-PCR) précédée d'un enrichissement pour la détection et la quantification de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* contenus dans des échantillons d'eau naturellement contaminés d'un volume de 2000 ml. Pour ce faire, la stratégie consistait, premièrement, à évaluer la faisabilité du projet en faisant l'étude du tracé des courbes de croissance de cellules de *Campylobacter* d'abord stressées par un séjour dans de l'eau environnementale et par la suite enrichies dans un milieu sélectif et nutritif. Cette expérience avait pour but d'évaluer la durée de la phase de latence et le temps de génération que pourraient engendrer des cellules stressées une fois remises dans un milieu favorable à leur division cellulaire. Ensuite, l'évaluation de 2 troupes d'extraction et de purification d'ADN devait être faite afin de s'assurer que les extraits d'ADN n'entraveraient pas le bon fonctionnement de la RT-PCR. Troisièmement, le choix et le développement d'une RT-PCR devaient être faits et une courbe standard externe découlant de cette RT-PCR devait être bâtie. Quatrièmement, la méthode MPN devait être utilisée pour valider la quantification obtenue via le protocole de qRT-PCR précédée d'un

enrichissement. Finalement, un protocole non publié permettant l'extraction d'ADN directement à partir d'une membrane filtrante, gracieusement partagé par l'équipe de VAN DYKE *et al.*, 2006, devait être testé par la même occasion, afin d'évaluer si cette technique serait plus efficace et reproductible que le protocole de qRT-PCR précédée d'un enrichissement.

Matériels et méthodes

A) Courbes de croissance :

Création des conditions de stress cellulaires. Six bouteilles opaques et stériles (Fisher Scientific) contenant 100 ml d'eau environnementale stérilisées par une membrane filtrante de 0,22 µm (Millipore Corporation) ont été inoculées avec 1×10^5 bactéries provenant d'une culture d'un isolat local de *C. jejuni* prélevé de fèces d'un patient diagnostiqué positif à *C. jejuni* et symptomatique. Cet isolat de *C. jejuni* avait préalablement été cultivé sur une gélose TSA pendant 20 h à 42°C en micro-aérobie. Ensuite, une suspension de 0,5 McFarland, correspondant à une concentration de 10^8 bactéries/ml, a été faite dans du bouillon Müeller-Hinton (BD Diagnostics) à l'aide d'un turbidimètre MicroScan (Dade Behring). À partir de cette suspension, une dilution en série de 10^5 à 10^8 bactéries/ml a été réalisée dans du bouillon Müeller-Hinton. Trois de ces bouteilles ont été incubées à 1°C (réfrigérateur) et les 3 autres bouteilles ont été incubées à 23°C (température de la pièce) et ce, soit pendant 24, 72 ou 168 h, en aérobie et à la noirceur. Les deux températures d'incubation ont été choisies en fonction du fait que du *Campylobacter* avait été observé à des températures variants entre 0,4 et 30,6°C, lors de l'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrie, et qu'il était important de

vérifier le comportement des cellules de *Campylobacter* suite à un séjour en eaux froides versus en eaux plus chaudes.

Création des conditions optimales de division cellulaire. Dix séries de 12 tubes coniques stériles de 15 ml (BD Diagnostics), contenant 10 ml de bouillon Preston (Oxoid) stériles, ont été inoculées avec une quantité théorique de 100 et de 1000 bactéries provenant de chacune des 6 bouteilles d'eau environnementale préalablement incubées à 1°C ou à 23°C et ce, en assumant qu'il y avait théoriquement 1×10^5 bactéries/100 ml (1000 bactéries/ml) dans chaque bouteille d'eau. Les 10 séries de 12 tubes coniques ont été incubées dans 10 jarres « GasPak EZ » (BD Diagnostics) différentes, pour permettre une incubation par tranche de 5 h pendant un premier 3 h à 37°C suivi de 47 h à 42°C, pour un total de 50 h d'incubation, en micro-aérobie (Figure 13). L'incubation des 10 séries de 12 tubes coniques dans 10 différentes jarres a été nécessaire afin d'éviter la perturbation, voire l'arrêt de la croissance du *Campylobacter* dû à la prise d'un échantillon de bouillon Preston à chaque tranche de 5 h d'incubation, car les « GasPak EZ Campy Container System Sachets » (BD Diagnostics) nécessitent environ 1 h pour établir l'atmosphère micro-aérobie optimale nécessaire à la croissance optimale du *Campylobacter* dans les jarres.

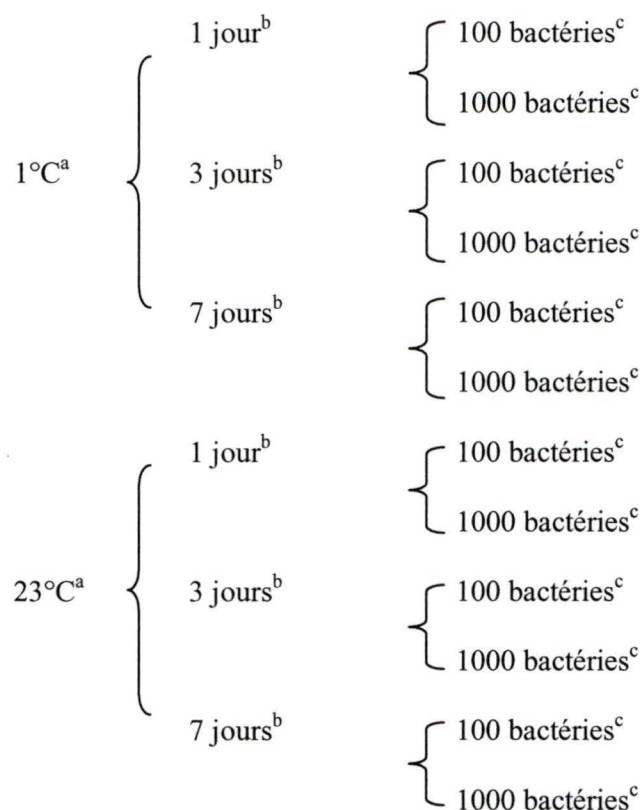


FIGURE 13. Répartition d'une série de 12 tubes coniques selon les différentes conditions de stress initiales créées en variant la température et la durée d'incubation dans les 6 bouteilles d'eau et ce, avant d'ensemencer les bouillons d'enrichissement avec 100 ou 1000 bactéries provenant de ces bouteilles. Dix séries de 12 tubes furent incubées séparément en micro-aérobie et une série était analysée à toutes les 5 h pendant 50 h. ^aTempérature de l'eau. ^bDurée du séjour dans l'eau. ^cInoculum initial dans le 10 ml de bouillon Preston au temps 0 h de l'enrichissement.

Dénombrement par la méthode d'étalement sur pétri. À chaque tranche de 5 h, pendant une période de 5 à 50 h, 2 x 100 µl de bouillon Preston bien homogénéisés et provenant de chacun des 12 tubes coniques contenus dans 1 jarre, ont été étalés sur deux géloses TSA (Oxoid) à l'aide d'un patin à étalement stérile. Ensuite, les géloses ont été incubées en micro-aérobie à 42°C pendant 48 h, avant de faire le dénombrement des colonies de *Campylobacter*. Il a été nécessaire de faire la planification théorique de la quantité de bactéries attendues après chaque tranche de 5 h d'incubation, sachant que, selon le NEW ZEALAND FOOD SAFETY AUTHORITY, 2008, le temps de génération du *Campylobacter* lors de sa phase exponentielle de croissance linéaire est en moyenne d'une durée d'environ 1 h, afin de prévoir et de faire les dilutions appropriées des échantillons de bouillon Preston avant l'étalement sur pétri, dans le but d'assurer la faisabilité du dénombrement des bactéries sur les géloses TSA. Il est à noter que pour le dénombrement au temps 0 h, ce sont 2 x 100 µl d'eau provenant directement de chacune des 6 bouteilles d'eau qui ont été utilisés.

La portion A) de l'étude (courbes de croissance) a été réalisée en triplicata (3 expériences indépendantes), afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats obtenus.

B) Évaluation de 2 trousse d'extraction et de purification d'ADN :

Deux trousse commerciales d'extraction et de purification d'ADN, soit la trousse « Bugs'n BeadsTM version S » de GenPoint découverte via les travaux de RUDI *et al.*, 2004, et la trousse « DNeasy® Blood & Tissue » de Qiagen, ont été testées sur des échantillons d'eau environnementale afin de déterminer laquelle de ces

2 trousse d'extraction et de purification d'ADN permettrait d'obtenir des extraits d'ADN donnant des résultats reproductibles et qui n'entraveraient pas le bon fonctionnement de la réaction de RT-PCR. Cette évaluation a dû être faite, car la méthode d'extraction d'ADN au NaOH, utilisée lors de l'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrie, ne produisait pas d'ADN propre, c'est-à-dire sans débris cellulaires, substances inhibitrices ou autres, ce qui entravait le fonctionnement normal de la réaction de RT-PCR.

Échantillons d'eau environnementale utilisés pour l'évaluation des trousse d'extraction et de purification d'ADN. Lors de l'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrie, 2 x 1,5 ml de bouillon d'enrichissement avaient été prélevés pour chaque site de prélèvement d'eau environnementale. Les échantillons avaient ensuite été centrifugés pendant 5 min à 13 000 rpm (~ 15 860 x g) et seul le culot avait été conservé à -20°C. Ainsi, 91 culots ont été utilisés pour l'évaluation des 2 trousse d'extraction et de purification d'ADN décrites ci-dessous.

Extraction et purification d'ADN avec la trousse « Bugs'n Beads™ version S » de GenPoint. Selon les spécifications du fabricant (GENPOINT, 2007), 300 µl d'eau distillée stérile ont été mélangés au culot bactérien. Ensuite, 20 µl de billes « Bacteria binding » et 600 µl de tampon « Binding » ont été ajoutés et le tout a été incubé à la température de la pièce pendant 5 min. Le tout a ensuite été placé sur un support magnétique pendant 2 min. Le surnageant a ensuite été enlevé, 50 µl de « POWERlyse » ont été mélangés au culot et le tout a été incubé à la température de la

pièce pendant 1 min. Après, 150 µl d'éthanol 96% ont été ajoutés et le tout a été incubé à la température de la pièce pendant 5 min. Ensuite, le tout a été placé sur le support magnétique pendant 2 min. Le surnageant a été enlevé, 1 ml d'éthanol 70% a été ajouté et le tout a encore une fois été placé sur le support magnétique pendant 2 min. Cette dernière étape a été répétée 2 fois. Le surnageant a été enlevé à nouveau, 50 µl de mélange eau distillée stérile-albumine de sérum bovin (BSA) 0,1% (New England Biolabs) ont été ajoutés et le tout a été incubé à 85°C pendant 10 min. Le tout a une dernière fois été placé sur le support magnétique pendant 2 min et le surnageant contenant l'ADN extrait a été conservé à -20°C.

Extraction et purification d'ADN avec la trousse « DNeasy® Blood & Tissue » de Qiagen. Selon les spécifications du fabricant (QIAGEN, 2006b), 180 µl de tampon ATL et 20 µl de protéinase K fournie par le fabricant ont été mélangés au culot bactérien. Le tout a été incubé pendant 2 h à 56°C. Ensuite, 200 µl de tampon AL et 200 µl d'éthanol 96% ont été ajoutés et le tout a été transféré dans une colonne « DNeasy Mini spin » et centrifugé pendant 1 min à 8000 rpm (~ 6000 x g). Puis, 500 µl de tampon AW1 ont été ajoutés à la colonne et le tout a été centrifugé à nouveau pendant 1 min à 8000 rpm (~ 6000 x g). Ensuite, 500 µl de tampon AW2 ont été ajoutés et le tout a été centrifugé pendant 3 min à 13 000 rpm (~ 15 860 x g). Finalement, 400 µl de tampon AE ont été ajoutés à la colonne et l'ADN a été élué par centrifugation pendant 1 min à 8000 rpm (~ 6000 x g). Les extraits d'ADN ont été conservés à -20°C.

C) Développement de la qRT-PCR :

Le choix du type et de la technologie utilisés pour la détection et la quantification par qRT-PCR précédée d'un enrichissement de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* a été inspiré des travaux de PERELLE *et al.*, 2004. Cette équipe avait utilisé la technologie d'hybridation de 2 sondes et des amorces permettant la détection spécifique du gène de l'ARNr 16S de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*, les mêmes amorces que celles utilisées pour la PCR 16S lors de l'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrie. Pour le développement de la qRT-PCR précédée d'un enrichissement, la technologie d'hybridation de 2 sondes a été utilisée, mais de nouvelles sondes et de nouvelles amorces basées sur la détection du gène de l'ARNr 16S de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*, gène qui se retrouve en 3 copies dans le génome du *Campylobacter*, ont été bâties. En effet, les sondes décrites par PERELLE *et al.*, 2004 ne semblaient pas être optimales pour une RT-PCR. De plus, étant donné que la RT-PCR est une méthode très sensible et que les amorces décrites par PERELLE *et al.*, 2004 avaient déjà été grandement utilisées pour la PCR 16S conventionnelle lors de l'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrie, cela a entraîné des problèmes importants de contamination de la RT-PCR dans le laboratoire. Afin de régler ce problème, la réorganisation de l'endroit et des techniques de travail, l'utilisation de l'enzyme « Uracil-DNA glycosylase » et la construction d'amorces légèrement décalées de la séquence originale des amorces décrites par PERELLE *et al.*, 2004 (Figure 14) ont été entreprises.

A

```
Campy_jejuni C-TCTATACTCCTGCTTAACA-CA-AGTTGAGTAGGGAAAGTNTT'  
Campy_coli C-TCTATACTCCTGCTTAACA-CA-AGTTGAGTAGGGAAAGTTTT'  
Campy_lari C-TCTATACTCCTGCTTAACA-CA-AGTTGAGTAGGGAAAGTTTT'
```

B

```
Campy_jejuni ATT--CTGACGGTACCTAAGGAATAAGCACCGGCT  
Campy_coli ATT--CTGACGGTACCTAAGGAATAAGCACCGGCT  
Campy_lari ATT--CTGACGGTACCTAAGGAATAAGCACCGGCT
```

FIGURE 14. Emplacement des amorces OT1559 et 18-1 décrites par PERELLE *et al.*, 2004 (en vert) par rapport aux nouvelles amorces 16SCampF et 16SCampR construites pour la qRT-PCR précédée d'un enrichissement (en jaune) sur le gène de la sous-unité ribosomale 16S de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*. **A.** Amorces « forward » ; OT1559 en vert et 16SCampF en jaune. **B.** Amorces « reverse » ; 18-1 en vert et 16SCampR en jaune. (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2005)

Souches de référence. *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, *Campylobacter coli* ATCC 49941, *Campylobacter lari* LSPQ 3218, *Campylobacter upsaliensis* ATCC 49815, *Campylobacter fetus* LSPQ 2979, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Clostridium difficile* ATCC 43255, *Enterobacter aerogenes* ATCC 35029, *Enterobacter cloacae* ATCC 23355, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715 ont été utilisés afin d'évaluer la spécificité de la qRT-PCR. Toutes les souches ont été conservées à -80°C dans des tubes Microbank (Pro-Lab Diagnostics).

RT-PCR. Cette RT-PCR permet seulement la détection, et non la distinction, de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* et ce, via la détection du gène de l'ARNr 16S. Les concentrations finales pour la réaction de RT-PCR, d'un volume final de 15 µl, étaient les suivantes : solution de réaction « LightCycler® FastStart DNA Master^{Plus} HybProbe mix » 1X (Roche Applied Science) ; 0,5 µM pour chacune des amorces 16ScampF (5'-CTC TAT ACT CCT GCT TAA CAC-3') et 16SericR (5'-GCC GGT GCT TAT TCC TTA GG-3') (Integrated DNA Technologies) ; 0,1 µM de chacune des sondes CampRNAef1FAM (5'-IowaBlackFQ-AGC AAC GCC GCG TGG AGG ATG ACA CTT-FAM-3') et CampRNAef2CF610 (5'-CALFluorRed610-TCG GAG CGT AAA CTC CTT TTC TTA GGG AA-Phosphate-3') (Integrated DNA Technologies) ; 0,25 U d'enzyme « LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase » (Roche Applied Science) ; 5 µl d'extrait d'ADN et le volume final a été complété avec de l'eau « PCR Grade » (Roche Applied Science). Le tout a été déposé dans des « LightCycler® Capillaries 20 µl » (Roche Applied Science). Le programme de RT-

PCR était le suivant : 1 x (10 min à 95°C), 45 x (10 sec à 95°C, 15 sec à 58°C, 15 sec à 72°C) avec un taux de transition de la température de 2°C/sec, 1 x (30 sec à 40°C). Le signal de fluorescence généré lors de l'amplification a été mesuré durant l'étape d'appariement des amorces à 58°C dans le canal F2 (640 nm) du thermocycleur. La réaction d'amplification a été faite à l'aide d'un thermocycleur LightCycler 1.2 (Roche Applied Science).

Construction de la courbe standard externe. La courbe standard externe a été bâtie à partir d'échantillons étalons provenant d'une dilution en série d'un facteur de 10 de la souche de *C. jejuni* ATCC 33560. La souche de *C. jejuni* a été cultivée sur une gélose TSA pendant 20 h à 42°C en micro-aérobie. Ensuite, une suspension de 0,5 McFarland, correspondant à une concentration de 10^8 bactéries/ml, a été faite dans du bouillon Müeller-Hinton (BD Diagnostics) à l'aide d'un tubidimètre MicroScan (Dade Behring). À partir de cette suspension, une dilution en série de 10^0 à 10^8 bactéries/ml a été réalisée dans du bouillon Müeller-Hinton et l'ADN contenu dans 1 ml de chaque dilution a été extrait à l'aide de la trousse « DNeasy® Blood and Tissue » de Qiagen selon les spécifications du fabricant (QIAGEN, 2006b). Afin de s'assurer du nombre réel de bactéries contenu dans chaque dilution, 20 µl des dilutions 10^0 à 10^3 ont été étalés sur une gélose TSA et incubés à 42°C pendant 48 h afin d'en faire le dénombrement. Ainsi, ce sont 5 µl d'extrait d'ADN d'une concentration de $6,25 \times 10^0$ à $6,25 \times 10^8$ bactéries/ml qui ont été soumis à la RT-PCR décrite précédemment et ce, en triplicata. La moyenne des Ct obtenus pour chaque étalon a été mise en relation avec le logarithme du nombre de bactéries correspondant, afin de former la courbe standard externe. La quantification obtenue avec cette courbe standard externe est exprimée en unités formatrices de colonies par litre (CFU/L).

D) Validation de la qRT-PCR précédée d'un enrichissement avec la méthode MPN et comparaison avec l'extraction d'ADN directe sur membrane filtrante :

Échantillons d'eau environnementale. Ce sont 15 sites d'échantillonnage d'eau environnementale (rivières et ruisseaux), utilisés lors l'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrie et ayant une prévalence élevée du *Campylobacter*, qui ont été sélectionnés pour valider la quantification par qRT-PCR précédée d'un enrichissement. Les mêmes sites ont été utilisés pour comparer l'efficacité de la méthode d'extraction d'ADN directement à partir de la membrane filtrante de l'équipe de VAN DYKE *et al.*, 2006 et celle de la qRT-PCR précédée d'un enrichissement. Ainsi, du 21 octobre 2007 au 25 novembre 2007, ces 15 sites, situés dans 3 différentes MRC de l'Estrie (Coaticook, Sherbrooke et Val St-François), ont été échantillonnés hebdomadairement de la même façon que lors de l'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrie. Cependant, ce sont des échantillons d'eau de surface d'environ 5000 ml, prélevés dans 2 x 2000 ml et 2 x 500 ml bouteilles stériles (Fisher Scientific), qui ont été utilisés plutôt que des échantillons d'environ 3000 ml. Une fois au laboratoire, pour chacun des 15 sites, l'eau contenue dans les 2 bouteilles de 2000 ml a été bien homogénéisée et a ensuite été redistribuée dans les 2 bouteilles de 2000 ml et ce, afin de s'assurer que les 2 bouteilles de 2000 ml contenaient un échantillon d'eau « identique ». Ensuite une des 2 bouteilles de 2000 ml d'eau a été utilisée conjointement pour la quantification par la méthode MPN et par la qRT-PCR précédée d'un enrichissement et l'autre bouteille a été utilisée pour le protocole d'extraction d'ADN directement à partir de la membrane filtrante. Ainsi, les résultats quantitatifs

obtenus pour chacune des 3 méthodes étaient comparables entre elles, puisqu'elles ont été faites à partir d'un « même » échantillon d'eau.

Quantification par la méthode MPN. Le même protocole de quantification par la méthode MPN, utilisé lors de l'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrie, a été exploité dans le cadre de ce projet. Cependant, pour chaque volume de 2000 ml seulement, un échantillon de 1,5 ml de bouillon Preston bien homogénéisé a été prélevé après une incubation de 16 h (3 h à 37°C, suivi de 13 h à 42°C) et ce, afin d'être utilisé pour la quantification par qRT-PCR précédée d'un enrichissement. L'incubation des volumes de 2000 ml a, par la suite, immédiatement été poursuivie, en micro-aérobie, pour un total de 48 h et ce, pour les besoins de la quantification par la méthode MPN. L'identification à l'espèce des isolats de *Campylobacter* récoltés a été faite à l'aide des tests biochimiques de routine et de l'approche moléculaire (PCR hippurate, PCR 16S et PCR-RFLP) (Figure 15). Tous les isolats de *Campylobacter* ont été conservés dans des tubes Microbank (Pro-Lab Diagnostics) à -80°C.

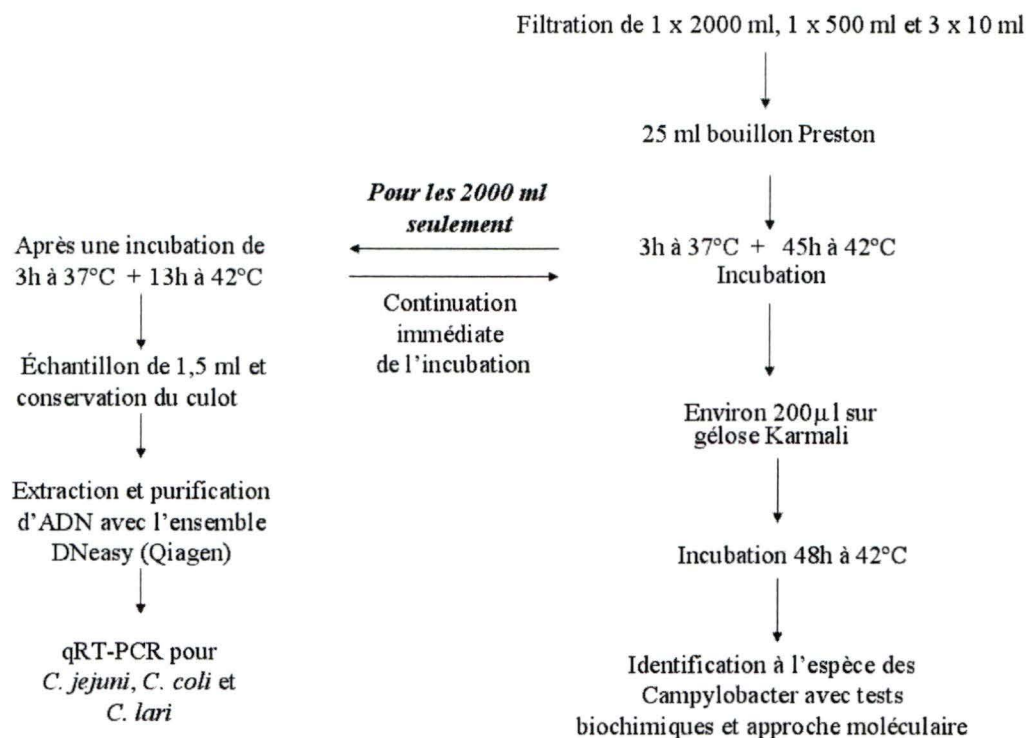


FIGURE 15. Schéma d'analyses des dilutions d'un site de prélèvement d'eau environnementale pour la quantification par qRT-PCR précédée d'un enrichissement (gauche) et par la méthode MPN (droite). Pour chaque volume de 2000 ml seulement, un échantillon de 1,5 ml de bouillon Preston bien homogénéisé a été prélevé après une incubation de 16 h (3 h à 37°C suivi de 13 h à 42°C). L'incubation de ces volumes de 2000 ml a, par la suite, immédiatement été poursuivie pour un total de 48 h et ce, pour les besoins de la quantification par la méthode MPN.

Quantification par qRT-PCR précédée d'un enrichissement. Les échantillons de 1,5 ml de bouillon Preston, prélevés pour chaque volume de 2000 ml de chaque site après un enrichissement de 16 h (3 h à 37°C, suivi de 13 h à 42°C) (Figure 15), ont été centrifugés à 13 000 rpm ($\sim 15\,860 \times g$) pendant 10 min. Ensuite, seul le culot a été conservé et l'ADN contenu dans le culot a été extrait et purifié à l'aide de la trousse « DNeasy® Blood and Tissue » de Qiagen selon les spécifications du fabricant (QIAGEN, 2006b). Ensuite, 5 μ l d'extrait d'ADN ont été soumis à la RT-PCR, en triplicata, et le Ct moyen obtenu a été comparé à la courbe standard externe afin d'en extrapoler le logarithme du nombre de bactéries correspondant. Ensuite, en considérant tous les facteurs de dilution rencontrés dans le protocole, de la filtration d'un volume 2000 ml d'eau jusqu'à l'analyse de 5 μ l d'extrait d'ADN par RT-PCR, l'estimation de la quantité de *Campylobacter* contenue initialement dans l'échantillon d'eau de 2000 ml a pu être extrapolée en CFU/L.

Extraction d'ADN faite directement à partir de la membrane filtrante. Ce protocole non publié a été gracieusement partagé par l'équipe de VAN DYKE *et al.*, 2006. Un échantillon d'eau environnementale de 2000 ml, provenant de chacun des 15 sites, a été filtré à l'aide d'une membrane stérile de 0,45 μ m. Lorsque cela a été nécessaire, les échantillons d'eau turbides ont été pré-filtrés avec une membrane stérile de 1,5 μ m et cette membrane, ainsi que sa membrane de 0,45 μ m correspondante, ont été placées dans un tube conique de 15 ml contenant 2 ml de tampon de guanidine isothiocyanate (GITC) (Bioshop Life Science Products) et le tout a été mélangé à la température de la pièce pendant 1 h à l'aide d'un appareil « Gyrotory Water Bath Shaker » (New Brunswick). Le tube conique a, par la suite, été centrifugé à 2000 rpm ($\sim 375 \times g$) pendant 2 min 30 sec. Le surnageant a été conservé dans un nouveau tube

conique et le tout a été centrifugé à 13 000 rpm ($\sim 15\,860 \times g$) pendant 5 min. L'ADN contenu dans tout le surnageant a été extrait et purifié avec la trousse « DNeasy® Blood and Tissue » de Qiagen selon les spécifications du fabricant (QIAGEN, 2006b). Ensuite, 5 μ l d'extrait d'ADN ont été soumis à la RT-PCR, en triplicata, et le Ct obtenu a été comparé à la courbe standard externe afin d'en extrapoler le logarithme du nombre de bactéries correspondant. Ensuite, en considérant tous les facteurs de dilution rencontrés dans le protocole, de la filtration d'un volume de 2000 ml d'eau jusqu'à l'analyse de 5 μ l d'extrait d'ADN par RT-PCR, l'estimation de la quantité de *Campylobacter* contenue initialement dans l'échantillon d'eau de 2000 ml a pu être faite en CFU/L.

Analyses statistiques. La force d'association ou de correspondance, entre la quantification obtenue par la méthode MPN et la quantification obtenue soit par la qRT-PCR précédée d'un enrichissement ou soit par l'extraction d'ADN directe sur membrane filtrante, a été mesurée avec le rho de Spearman (ρ), un test non-paramétrique, avec un niveau de signification alpha (α) fixé à 0,05.

Résultats

A) Courbes de croissance :

Phase de latence et temps de génération. Trois expériences indépendantes réalisées sur un isolat de *C. jejuni* prélevé de fèces d'un cas humain local de campylobactériose et ayant subi des combinaisons différentes de stress pouvant être occasionnées lors d'un séjour dans de l'eau environnementale, ont été réalisées afin d'en observer les courbes de croissance résultantes, *in vitro*. Les résultats moyens obtenus au cours de ces 3 expériences sont illustrés dans la figure 16 et ce, en fonction

de l'inoculum initial. Pour les besoins du projet, la figure 16 permet d'observer que, peu importe le stress subis par les cellules de l'isolat de *C. jejuni*, elles semblent engendrer toutes sensiblement le même profil de courbe de croissance, c'est-à-dire, qu'elles semblent toutes produire une phase de latence d'environ 5 h, leur phase exponentielle semble être linéaire entre 10 et 20 h d'enrichissement et leur phase plateau semble être enclenchée après environ 25 h d'enrichissement, sauf pour les deux courbes générées par un inoculum initial de 100 et de 1000 bactéries ayant séjourné pendant 168 h dans une eau environnementale à 23°C, car des données sont manquantes dues à des erreurs de manipulation. La diminution beaucoup moins prononcée du \log_{10} du nombre de bactéries après 5 h d'enrichissement pour seulement trois courbes générées par un inoculum initial de 1000 bactéries, peut peut-être simplement être expliquée par des erreurs de manipulation. En effet, les tubes coniques n'ont peut-être pas été suffisamment bien homogénéisés ou encore une goutte de bouillon sur le pourtour extérieur de l'embout de micropipette a peut-être été déposée par mégarde sur la gélose TSA, ce qui, dans les deux cas, aurait entraîné une hausse du nombre de colonies sur la gélose TSA et, de ce fait, aurait faussé à la hausse le dénombrement.

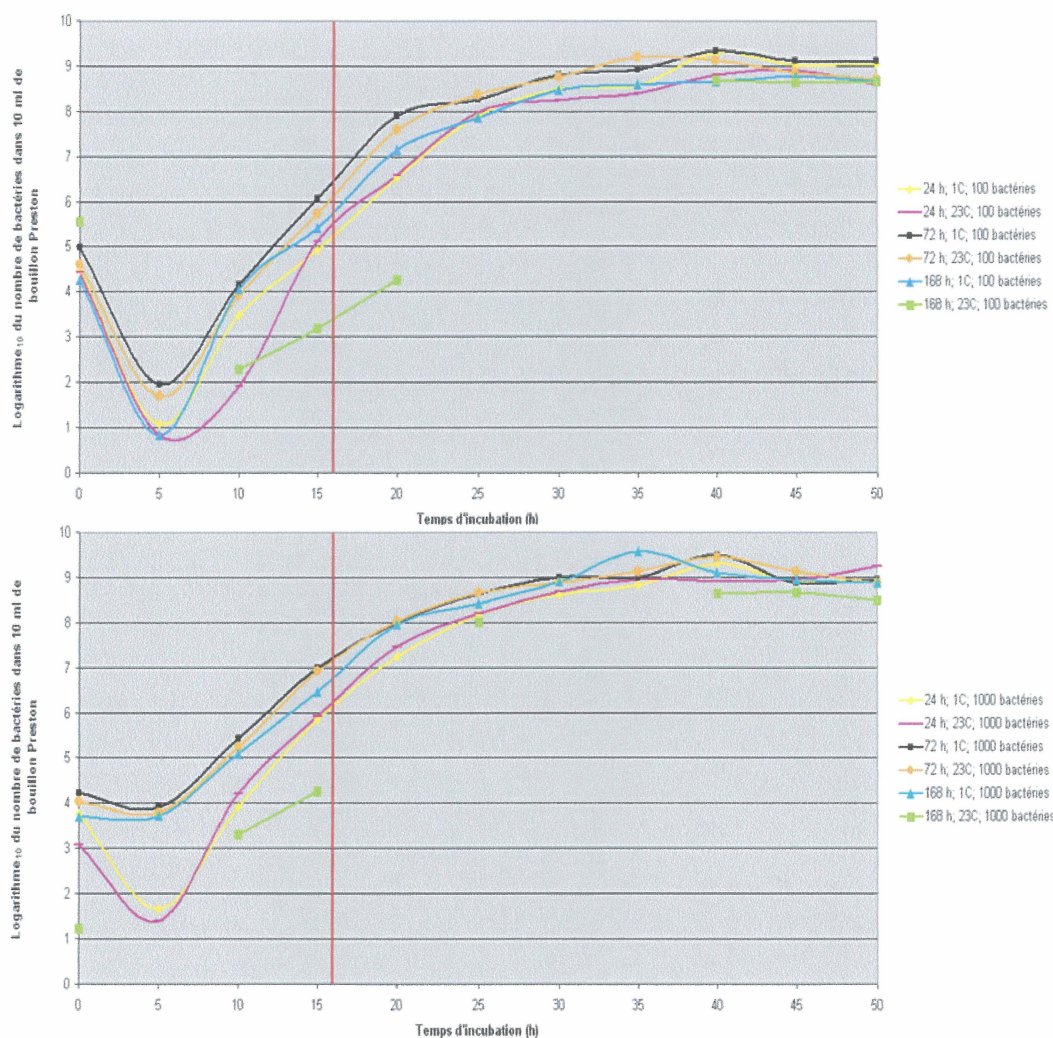


FIGURE 16. Courbes de croissance moyennes d'un *C. jejuni* enrichies pendant 50 h.

Légende : 24, 72, 168 h. Nombre d'heures séjournées dans l'eau. 1°C, 23°C.

Température à laquelle les cellules ont séjournées dans l'eau. 100, 1000 bactéries.

Inoculum initial théorique dans le bouillon Preston au temps 0 h de l'enrichissement.

Si l'enrichissement dans le bouillon Preston à 42°C, en micro-aérobie, engendre un temps de génération relativement uniforme pour toutes les cellules de l'isolat de *C. jejuni*, quelle que soit la condition cellulaire initiale causée par les différents stress occasionnés par un séjour d'une durée et à une température variable dans de l'eau environnementale, 10 fois plus de cellules devraient être trouvées dans un échantillon dont l'inoculum initial théorique était de 1000 bactéries versus 100 bactéries. Ainsi, si un point situé au centre de la phase exponentielle linéaire des courbes de croissance de la figure 16 est utilisé, il est possible de constater qu'après 15 h d'enrichissement, en moyenne, il y a effectivement 10 fois (varie entre 0,8 et 1,2 \log_{10}) plus de cellules lorsque l'inoculum initial théorique était de 1000 bactéries comparativement à 100 bactéries (Tableau 7). La même constatation peut être faite pour les points à 10 h et à 20 h d'enrichissement, à quelques exceptions près (Tableau 7). Le temps de génération moyen a été estimé à 62 ± 17 min (Tableau 8), lorsque les cellules de l'isolat de *C. jejuni* sont enrichies dans du bouillon Preston, à une température de 42°C et en micro-aérobie. Le temps de génération a été déterminé comme suit : Temps de génération = temps d'incubation \div \log_2 (nombre de bactéries au temps $t_2 \div$ nombre initial de bactéries au temps t_1) (PRESCOTT *et al.*, 1995).

TABLEAU 7. Évaluation de la différence du \log_{10} du nombre de cellules moyen de *C. jejuni* obtenu après 10, 15 ou 20 h d'enrichissement dans le bouillon Preston, selon que l'inoculum initial théorique soit de 100 bactéries ou de 1000 bactéries et ce, pour chaque condition de stress testée.

Conditions du séjour dans l'eau environnementale		Logarithme ₁₀ du nombre de cellules de <i>Campylobacter</i>								
		100 bactéries ^a			1000 bactéries ^a			Différence entre 100 et 1000 bactéries ^c		
Durée	Température	10 h ^b	15 h ^b	20 h ^b	10 h ^b	15 h ^b	20 h ^b	à 10 h ^b	à 15 h ^b	à 20 h ^b
24 h	1°C	3,5	4,9	6,5	3,9	5,8	7,2	0,4	0,9	0,7
	23°C	1,9	5,1	6,6	4,2	5,9	7,5	2,3	0,8	0,9
72 h	1°C	4,2	6,1	7,9	5,4	7,0	8,0	1,3	0,9	0,1
	23°C	3,9	5,7	7,6	5,2	6,9	8,0	1,3	1,2	0,4
168 h	1°C	4,1	5,4	7,1	5,1	6,5	7,9	1,0	1,1	0,8
	23°C	2,3	3,2	4,2	3,3	4,3	- ^d	1,0	1,1	-

^aInoculum initial théorique.

^bDurée de l'enrichissement dans le bouillon Preston.

^cDifférence entre le \log_{10} du nombre moyen de cellules de l'isolat de *C. jejuni* lorsque l'inoculum initial était de 1000 bactéries versus lorsqu'il était de 100 bactéries et ce, après un temps précis d'enrichissement dans le bouillon Preston.

^dAucune donnée expérimentale n'a pu être récoltée.

TABLEAU 8. Temps de génération issus de la courbe de croissance de cellules de l'isolat de *C. jejuni* ayant préalablement subi différents stress.

Conditions du séjour dans l'eau environnementale		Log ₁₀ nombre de cellules de <i>Campylobacter</i>						Temps de génération (minute)			
		100 bactéries ^a			1000 bactéries ^a			100 bactéries ^a		1000 bactéries ^a	
Durée	Température	10 h ^b	15 h ^b	20 h ^b	10 h ^b	15 h ^b	20 h ^b	10 à 15 h ^c	15 à 20 h ^c	10 à 15 h ^c	15 à 20 h ^c
24 h	1°C	3,5	4,9	6,5	3,9	5,8	7,2	62	56	47	65
	23°C	1,9	5,1	6,6	4,2	5,9	7,5	28	61	52	59
72 h	1°C	4,2	6,1	7,9	5,4	7,0	8,0	47	50	57	90
	23°C	3,9	5,7	7,6	5,2	6,9	8,0	50	48	53	83
168 h	1°C	4,1	5,4	7,1	5,1	6,5	7,9	67	52	65	61
	23°C	2,3	3,2	4,2	3,3	4,3	- ^d	100	84	96	-

^aInoculum initial théorique.

^bDurée de l'enrichissement dans le bouillon Preston.

^cIntervalle précis de temps d'enrichissement dans le bouillon Preston.

^dAucune donnée expérimentale n'a pu être récoltée.

Choix d'un temps d'enrichissement. Ainsi, à partir des courbes de croissance expérimentales exposées dans la figure 16, il a fallu déterminer quelle serait la durée de l'enrichissement la plus adéquate possible afin que le protocole de qRT-PCR précédée d'un enrichissement soit pratique et reproductible. Ainsi, un enrichissement d'une durée de 16 h semblait un choix judicieux, car il se situait au centre de la phase exponentielle linéaire de croissance des cellules de l'isolat de *C. jejuni*, car il a été observé que, dans cette zone de la courbe, l'enrichissement semblait être constant et proportionnel à l'inoculum initial et finalement car, ce temps est accommodant pour la planification des horaires des travailleurs.

B) Évaluation de deux trousse d'extraction et de purification d'ADN :

Choix de la trousse d'extraction et de purification d'ADN. La trousse « DNeasy® Blood and Tissue » de Qiagen a été sélectionnée pour effectuer toutes les extractions et purifications d'ADN contenues dans cette étude.

C) Développement de la qRT-PCR :

Spécificité et reproductibilité de la RT-PCR. La RT-PCR a été bâtie pour la détection spécifique de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*. Le tableau 9 démontre bien la grande spécificité de la RT-PCR pour le genre *Campylobacter*. Cependant, il est possible de constater que *C. upsaliensis* et *C. fetus* donnent également un faible résultat positif à la RT-PCR.

TABLEAU 9. Spécificité et reproductibilité de la RT-PCR obtenues après 3 essais.

Bactérie	Souche	RT-PCR (Ct)			Résultat
		# 1	# 2	# 3	
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560	12,19	12,13	12,02	+
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 49941	12,60	12,60	12,69	+
<i>Campylobacter lari</i>	LSPQ 3218	12,74	12,78	12,78	+
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	ATCC 49815	29,03	29,09	29,32	+
<i>Campylobacter fetus</i>	LSPQ 2979	33,02	34,27	34,29	+
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	-	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	ATCC 43255	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 35029	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 23355	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	-	-	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	ATCC 14018	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 13932	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> serovar					
Typhimurium	ATCC 14028	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 23715	-	-	-	-

+ : Résultat positif

- : Résultat négatif

Ensuite, afin d'exclure toute possibilité d'inhibition ou de faux négatifs et ainsi valider tous les résultats négatifs obtenus et ce, même si chaque échantillon a été préalablement testé en triplicata avec la RT-PCR, une quatrième réaction de RT-PCR était réalisée avec ces derniers, mais cette fois-ci en ajoutant 1 µl d'extrait d'ADN de la souche *C. jejuni* ATCC 33560 d'une concentration de $6,25 \times 10^4$ bactéries/ml dans la réaction de RT-PCR. Le tableau 9 permet également de constater que la RT-PCR est reproductible, car la différence entre les 3 valeurs de Ct obtenus pour chacune des 3 réactions de RT-PCR différentes ne dépasse pas 0,5, à l'exception de *C. fetus*.

Courbe standard externe. La figure 17 illustre la courbe standard externe construite et utilisée pour le protocole de qRT-PCR précédée d'un enrichissement et qui peut être traduite par la formule $Ct = -3,46 (\log_{10} \text{ du nombre de bactéries dans } 5 \mu\text{l}) + 35,97$, où tout $Ct \geq 35,97$ est considéré comme un résultat négatif. Il faut garder en mémoire que la qRT-PCR détecte le gène de l'ARNr 16S du *Campylobacter* et que cette bactérie possède 3 copies de ce gène dans son génome. Cette courbe standard est très satisfaisante avec un R^2 de 1, une pente de -3,46, une efficacité de 95% et une quantification linéaire fiable et reproductible sur 6 logarithmes. Ainsi, la qRT-PCR a une limite de détection évaluée entre 3 et 10 bactéries par réaction de RT-PCR, où 100% des essais sont positifs.

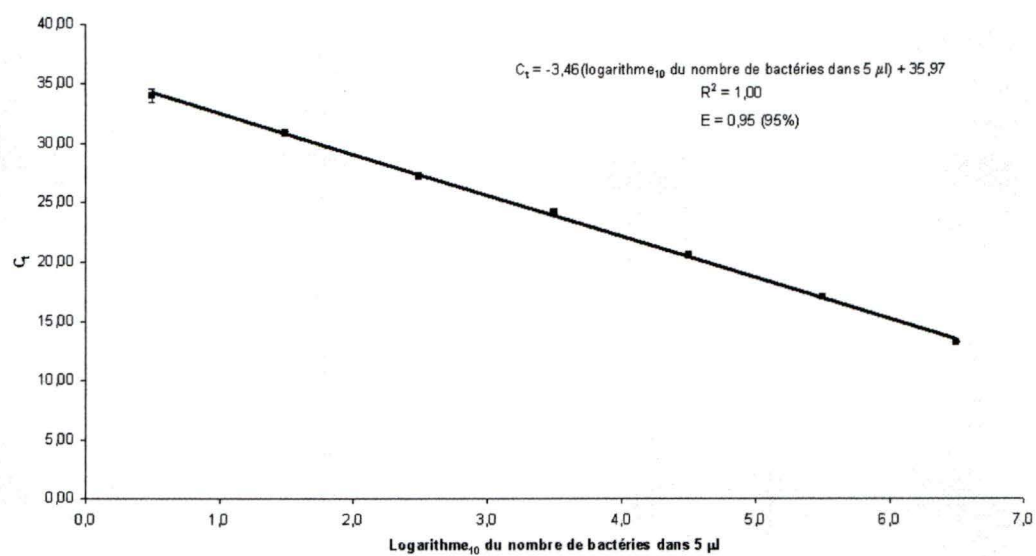


FIGURE 17. Courbe standard externe, créée à l'aide de la souche *C. jejuni* ATCC 33560, pour la quantification par qRT-PCR précédée d'un enrichissement.

La formule complète pour l'extrapolation de la quantité de *Campylobacter* contenue dans les échantillons d'eau avant enrichissement à partir du Ct obtenu du protocole de qRT-PCR précédée d'un enrichissement est la suivante : Quantité de bactéries/L = ((((((10^{((Ct - 35,97) - 3,46)}) x 400) ÷ 5) x 25) ÷ 1,5) ÷ (2¹¹)) ÷ 2. Cette formule découle du cheminement suivant :

- 1) W bactéries sont contenues dans un échantillon d'eau de 2 litres (2000 ml) et sont filtrées à l'aide d'une membrane filtrante.
- 2) Les W bactéries, retenues sur la membrane filtrante, sont plongées dans 25 ml de bouillon Preston.
- 3) W bactéries x 2¹¹ (le nombre de bactéries double à chaque heure d'enrichissement seulement pendant 11 h, car au cours des premières 5 h, il est pris pour acquis qu'elles sont en phase de latence) = X bactéries dans le 25 ml de bouillon Preston après 16 h d'enrichissement.
- 4) Un aliquot de 1,5 ml de bouillon Preston contenant Y bactéries est prélevé.
- 5) L'ADN des Y bactéries est extrait et élué dans 400 µl d'éluant provenant de l'ensemble « DNeasy® Blood and Tissue » de Qiagen.
- 6) Un aliquot de 5 µl d'extrait d'ADN contenant Z bactéries est soumis à la RT-PCR.
- 7) Selon la courbe standard externe : Z bactéries = 10^{((Ct - 35,97) - 3,46)}.

La formule complète pour l'extrapolation de la quantité de *Campylobacter* contenue dans les échantillons d'eau à partir du Ct obtenu du protocole d'extraction d'ADN directe à partir de la membrane filtrante est la suivante : Quantité de bactéries/L = (((10^{((Ct - 35,97) - 3,46)}) x 400) ÷ 5) ÷ 2. Cette formule découle du cheminement suivant :

- 1) X bactéries sont contenues dans un échantillon d'eau de 2 litres (2000 ml) et sont filtrées à l'aide d'une membrane filtrante.
- 2) Les X bactéries, retenues sur la membrane filtrante, sont plongées dans 2 ml de GITC.
- 3) L'ADN des X bactéries est extrait et élué dans 400 µl d'éluant provenant de l'ensemble « DNeasy® Blood and Tissue » de Qiagen.
- 4) Un aliquot de 5 µl d'extrait d'ADN contenant Y bactéries est soumis à la RT-PCR.
- 5) Selon la courbe standard externe : $Y \text{ bactéries} = 10^{((Ct - 35,97) + -3,46)}$.

D) Validation de la qRT-PCR précédée d'un enrichissement avec la méthode MPN et comparaison avec l'extraction d'ADN directe sur membrane filtrante :

Validation de la qRT-PCR précédée d'un enrichissement à l'aide de la méthode MPN. Dans le cadre de ce projet, il était prévu d'analyser 90 échantillons d'eau environnementale. Cependant, deux sites de prélèvement d'eau environnementale étaient recouverts de glace au cours d'une des deux dernières semaines de l'étude et n'ont donc pas pu être analysés. Ainsi, un total de 88 échantillons d'eau environnementale, échantillonnés à chaque semaine sur une période de 6 semaines, ont été analysés avec la méthode MPN et avec la qRT-PCR précédée d'un enrichissement. Les résultats quantitatifs obtenus en fonction des deux techniques sont exposés dans le tableau 10.

151

	= Résultat négatif
	= Inhibition de la qRT-PCR
MPNL	= Quantification par la méthode MPN
CFUL (qRT-PCR)	= Quantification par qRT-PCR
CFUL (GITC)	= Quantification par extraction d'ADN directe sur membrane filtrante

Il existe une corrélation forte entre la quantification obtenue par la méthode MPN et celle obtenue par la qRT-PCR précédée d'un enrichissement (ρ de Spearman = 0,84 ; $P < 0,001$). Dans 4 cas, une quantification de faible niveau (≤ 5 CFU/L) a pu être obtenue via la qRT-PCR précédée d'un enrichissement, mais pas via la méthode MPN. À l'inverse, dans 5 cas, la méthode MPN a pu faire la détection de faibles quantités ($\leq 0,89$ MPN/L) de *Campylobacter*, contrairement à la qRT-PCR précédée d'un enrichissement. Aussi, dans 3 cas, il y a eu inhibition de la qRT-PCR précédée d'un enrichissement. Les résultats obtenus pour les 3 cas où il y a eu inhibition de la qRT-PCR ont été exclus des calculs statistiques.

Comparaison de l'efficacité de la qRT-PCR précédée d'un enrichissement avec la méthode d'extraction d'ADN directe sur membrane filtrante. Comme le protocole d'extraction d'ADN directe sur membrane filtrante a été effectué en même temps que les protocoles de qRT-PCR précédée d'un enrichissement et de la méthode MPN, ce sont aussi 88 échantillons d'eau environnementale, échantillonnés à chaque semaine sur une période de 6 semaines, qui ont été analysés par le protocole d'extraction d'ADN directe sur membrane filtrante. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 10. Il est très intéressant de constater à quel point l'extraction d'ADN directe à partir de la membrane filtrante est peu efficace avec seulement 8 sites positifs comparativement à 53 sites pour la qRT-PCR précédée d'un enrichissement. Aussi, la corrélation entre la quantification obtenue par la méthode MPN et celle obtenue par la méthode d'extraction d'ADN directe sur membrane filtrante est faible (ρ de Spearman = 0,26 ; $P = 0,018$). Les résultats obtenus pour les 3 cas où il y a eu inhibition de la qRT-PCR ont été exclus des calculs statistiques.

Discussion et conclusion

Le protocole de qRT-PCR précédée d'un enrichissement décrit dans cette étude s'avèrerait être un protocole très intéressant pour le cas particulier de la quantification du *Campylobacter* dans l'eau. En effet, comme le *Campylobacter* est généralement retrouvée en faible quantité dans l'eau (SAVILL *et al.*, 2001) (TILL *et al.*, 2008) (ST-PIERRE *et al.*, soumis pour publication), cela implique qu'il faudrait faire l'analyse de grands volumes d'échantillon d'eau afin de pouvoir éviter le plus possible les faux résultats négatifs. L'incorporation d'une étape d'enrichissement dans le protocole de qRT-PCR a été faite pour palier à ce problème, car elle permet vraisemblablement d'augmenter le nombre initial de bactéries d'un facteur constant (temps de génération moyen de 62 ± 17 min pour un isolat de *C. jejuni* dans du bouillon Preston, à une température de 42°C, en micro-aérobie) (Tableau 8) et ce, afin de pouvoir optimiser la détection et la quantification du *Campylobacter* et rendre la méthode reproductible. Ainsi, seul un échantillon d'un volume de 2000 ml s'avèrerait nécessaire pour la quantification du *Campylobacter* par la qRT-PCR précédée d'un enrichissement versus, par exemple, 5 volumes différents pour la méthode MPN. De plus, contrairement à la méthode MPN, la réaction de RT-PCR développée dans ce projet a démontré une grande spécificité pour *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari*, les trois principales espèces trouvées dans l'eau lors de l'étude de la prévalence et de la quantité du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrie. Il a cependant été observé que *C. upsaliensis* et *C. fetus* étaient également faiblement détectées par la RT-PCR, mais cela peut être dû au fait qu'il y a une différence de moins de 5 nucléotides entre chacune des deux amorces et des deux sondes et leurs sites d'appariement potentiels sur les séquences du gène de l'ARNr 16S de *C. upsaliensis* et *C. fetus*, ce qui peut entraîner un faible taux d'amplification de ces deux espèces de *Campylobacter*

pathogènes pour l'humain. Aussi, la réaction de RT-PCR a une limite inférieure de détection très acceptable évaluée entre 3 et 10 bactéries par réaction de RT-PCR et cette limite de détection est comparable à la limite de détection d'autres RT-PCR déjà publiée par DEBRETSION *et al.*, 2007 et par WOLFFS *et al.*, 2007, par exemple. Ainsi, la combinaison d'une étape d'enrichissement et d'une RT-PCR sensible et spécifique fait en sorte que le protocole de qRT-PCR précédée d'un enrichissement est prometteur et pourrait éventuellement devenir un outil simple et spécifique pour le suivi efficace de la qualité de l'eau de consommation et de l'eau à des fins récréatives.

L'enjeu majeur dans ce projet était de vérifier si des cellules de *Campylobacter* différemment stressées par un séjour dans de l'eau environnementale allaient générer sensiblement la même période de latence et le même temps de génération lors de leur phase exponentielle de croissance et ce, une fois soumises à l'étape d'enrichissement dans du bouillon Preston, à une température de 42°C, en micro-aérobie. Le meilleur moyen d'obtenir ce genre d'informations semblait être par l'entremise de l'étude du tracé des courbes de croissance de cellules infectieuses de *Campylobacter* préalablement stressées par des conditions qui reflètent certaines conditions naturelles de l'eau environnementale. Un isolat de *C. jejuni* a été utilisé plutôt qu'une souche de référence (ex : ATCC) « adaptée » aux techniques de laboratoire, afin de pouvoir vérifier le comportement d'un « vrai » isolat infectieux pouvant représenter un risque réel s'il était rejeté dans l'eau environnementale. Ces informations précises étaient cruciales à obtenir car, à ma connaissance, elles n'étaient pas disponibles dans la littérature et la continuité du projet en dépendait. Ainsi, ce projet a permis d'observer qu'un enrichissement de 16 h, dans du bouillon Preston, à une température de 42°C, en micro-aérobie, permet d'augmenter le nombre de cellules d'un isolat de *C. jejuni*

contenu dans un échantillon d'eau naturellement contaminé par un facteur relativement constant (Tableau 8) et ce, peu importe la condition cellulaire initiale testée dans ce projet et occasionnée par un séjour dans de l'eau environnementale. Ce dernier fait est renforcé par l'observation d'une moyenne 10 fois plus élevée de cellules après un enrichissement de 15 h lorsque l'inoculum initial théorique était de 1000 bactéries comparativement à 100 bactéries (Tableau 7). Finalement, il a été possible de constater que, de façon générale, peu importe le type de stress subi par les cellules d'un isolat infectieux de *C. jejuni* au cours de cette étude, elles semblent toutes générer la même durée de phase de latence. Concrètement, cela semble signifier que le protocole de qRT-PCR précédée d'un enrichissement de 16 h dans du bouillon Preston, à une température de 42°C, en micro-aérobie, permettrait de pouvoir faire l'extrapolation de la quantité initiale de cellules de *Campylobacter* avant enrichissement et ce, à partir d'un résultat quantitatif obtenu suite à un enrichissement. Pour ce faire, il faudrait prendre en considération qu'il y a une phase de latence de 5 h et un temps de génération d'environ 1 h (Tableaux 7 et 8). Il est cependant important de comprendre que ces données ont été observées à partir des résultats obtenus pour un seul isolat de *C. jejuni*. Les travaux de BHAVSAR *et al.*, 2004, ont démontré que *C. coli* avait un temps de génération plus rapide que *C. sputorum* dans les mêmes conditions de culture. Il sera donc nécessaire de valider les résultats obtenus par l'étude du tracé des courbes de croissance d'un isolat de *C. jejuni* avec différents isolats de la même espèce et différents isolats de *C. coli* et de *C. lari* préalablement stressés et enrichis dans les mêmes conditions que pour l'isolat de *C. jejuni* testé dans cette étude. Ceci sera important, afin de s'assurer que différents isolats d'une même espèce, ainsi que différents isolats des deux autres espèces de *Campylobacter* pouvant être détectées par la RT-PCR incluse dans le protocole de qRT-PCR précédée d'un

enrichissement, produisent une phase de latence et un temps de génération similaires et ce, dans les mêmes conditions de cultures.

Afin de pouvoir valider la quantification obtenue par le protocole de qRT-PCR précédée d'un enrichissement, la méthode MPN a été utilisée comme méthode de référence. Ainsi, au cours de cette étude, dans 4 cas, une quantification de faible niveau (≤ 5 CFU/L) a pu être obtenue via la qRT-PCR précédée d'un enrichissement, mais pas via la méthode MPN (Tableau 10). Les valeurs moyennes de Ct (31,81 ; 33,67 ; 35,16 et 35,29) obtenues pour ces 4 cas sont très près de la valeur seuil de Ct (35,97) pour être déclaré négatif, ce qui peut laisser croire à des faux positifs qui auraient pu avoir été contaminés par un échantillon positif ou par des amplicons, par exemple. Néanmoins, dans cette étude, chaque échantillon a été soumis à trois réactions de RT-PCR indépendantes et, dans chacun des 4 cas, les triplicatas ont tous donné des valeurs de Ct semblables, ce qui peut laisser croire à des vrais faibles positifs. Cependant, il est également possible que ce soit l'extrait d'ADN mère qui est été contaminé. À l'inverse, dans 5 cas, la méthode MPN a pu faire la détection de faibles quantités ($\leq 0,89$ MPN/L) de *Campylobacter*, mais pas la qRT-PCR précédée d'un enrichissement (Tableau 10). Comme il s'agit de très faible quantité, il est possible que, lors de la prise d'un échantillon de 1,5 ml de bouillon Preston après 16 h d'enrichissement pour la qRT-PCR précédée d'un enrichissement, aucune bactérie n'ait été prélevée, ce qui aurait entraîné un faux résultat négatif. Il est également possible que la RT-PCR ait été partiellement inhibée, ce qui aurait fait en sorte que la RT-PCR n'aurait tout simplement pas pu détecter cette faible quantité de *Campylobacter*, car elle aurait été en-dessous de la limite inférieure de détection de la RT-PCR, mais cette hypothèse reste à être vérifiée. Toutefois, il est important de

remarquer que, dans 2 de ces cas sur 5, le volume de 2000 ml avait été déclaré négatif par la méthode MPN, ce qui peut probablement expliquer pourquoi la qRT-PCR précédée d'un enrichissement avait déclaré ces échantillons négatifs (Tableau 10), car il faut le rappeler, la qRT-PCR précédée d'un enrichissement a été appliquée sur les mêmes volumes de 2000 ml utilisés par la méthode MPN. Dans cette même voie, il y a 7 échantillons d'eau dans lesquels le *Campylobacter* a pu être quantifié par la méthode MPN, mais seulement à cause du fait que le volume de 500 ml et de 1 à 3 volumes de 10 ml avaient été déclarés positifs, tous les volumes de 2000 ml étant négatifs par la méthode MPN (Tableau 10). Sur ces 7 échantillons, seuls 3, dont 1 qui contenait des inhibiteurs de RT-PCR, ont été déclarés négatifs par la qRT-PCR (Tableau 10), ce qui signifie que dans 4 cas, la qRT-PCR précédée d'un enrichissement a pu détecter et quantifier le *Campylobacter* dans un volume de 2000 ml, mais pas la méthode MPN. Dans 3 cas, il y a eu inhibition de la qRT-PCR précédée d'un enrichissement (Tableau 10) et ceci était probablement dû à des extraits d'ADN insuffisamment purifiés, car les résultats sont demeurés négatifs même après l'ajout d'ADN de la souche de référence *C. jejuni* ATCC 33560 dans la réaction de RT-PCR. Aucune investigation sur la nature des inhibiteurs n'a été faite. Finalement, les résultats quantitatifs obtenus via la qRT-PCR précédée d'un enrichissement sont comparables aux résultats quantitatifs obtenus via la méthode MPN (ρ de Spearman = 0,84 ; $P < 0,001$). Cependant, l'association entre les valeurs quantitatives obtenues pour chacune des 2 méthodes aurait probablement pu être plus forte si la méthode MPN avait été une méthode plus précise, car il faut insister sur le fait que la méthode MPN utilisant cinq volumes (1 x 2000, 1 x 500 et 3 x 10 ml), ne permet d'obtenir que 16 valeurs de MPN/L possibles entourées de grands intervalles de confiance, contrairement à la qRT-PCR précédée d'un enrichissement.

Lorsque les résultats quantitatifs obtenus par la méthode MPN et par la qRT-PCR précédée d'un enrichissement sont plus amplement analysés, on peut remarquer que, pour les échantillons pour lesquels le volume de 2000 ml a été déclaré négatif, mais que le volume de 500 ml et deux ou trois volumes de 10 ml (0-1-3 ou 0-1-2) ont été déclarés positifs par la méthode MPN, les résultats quantitatifs obtenus par la qRT-PCR précédée d'un enrichissement correspondant semblent donner des résultats comparables à ceux obtenus par la qRT-PCR lorsque les cinq volumes (1-1-3) ont été déclarés positifs par la méthode MPN (Tableau 10). Cependant, selon la méthode MPN, une combinaison 0-1-3 donne une valeur de 1,8 MPN/L tandis qu'une combinaison 1-1-3 donne une valeur de 604,52 MPN/L (Tableau 10). Logiquement, si les volumes de 500 et de 10 ml sont positifs pour le *Campylobacter*, le volume de 2000 ml devrait également être positif étant donné que les échantillons d'eau proviennent du même site de prélèvement et que plus le volume de l'échantillon est grand, plus les chances de détecter du *Campylobacter* sont grandes. Cette situation semble insensée, mais elle est survenue et elle peut être, en partie, expliquée par le fait que la méthode MPN repose majoritairement sur des méthodes de culture, ce qui peut faire en sorte que la présence du *Campylobacter* a pu être masquée par une trop grande abondance d'autres microorganismes contaminants et ainsi provoquer de faux résultats négatifs.

C'est la trousse « DNeasy® Blood and Tissue » de Qiagen qui a été sélectionnée pour effectuer toutes les extractions et purifications d'ADN contenues dans cette étude. En réalité, la trousse « Bugs'n Beads™ version S » de GenPoint comportait beaucoup plus de désavantages comparativement à la trousse « DNeasy®

Blood and Tissue » de Qiagen. En effet, la trousse de GenPoint était beaucoup plus dispendieuse, avec un coût de 6,10 \$ par extraction d'ADN comparativement à 2,80 \$ par extraction d'ADN pour la trousse de Qiagen. De plus, les extractions et purifications d'ADN faites avec la trousse de GenPoint étaient beaucoup plus complexes et longues à réaliser, ce qui favorisait la perte non-négligeable de matériel génétique au cours du processus et une difficulté à uniformiser la technique d'un travailleur à l'autre afin d'obtenir des résultats reproductibles. Finalement, la trousse de GenPoint ne produit qu'un extrait d'ADN de faible volume (moins de 50 µl) comparativement aux extraits produits par la trousse de Qiagen (400 µl), ce qui réduit considérablement le nombre de tests possibles qui peut être fait avec le même extrait d'ADN.

Ensuite, un protocole non publié permettant l'extraction d'ADN directement à partir d'une membrane filtrante, gracieusement partagé par l'équipe de VAN DYKE *et al.*, 2006, a été testé par la même occasion, afin d'évaluer si cette technique serait plus efficace et reproductible que la qRT-PCR précédée d'un enrichissement. Il est très intéressant de constater à quel point l'extraction d'ADN directe à partir de la membrane filtrante est peu efficace avec seulement 8 sites déclarés positifs comparativement à 53 sites pour la qRT-PCR précédée d'un enrichissement (Tableau 10). Aussi, la corrélation entre la quantification obtenue par la méthode MPN et celle obtenue par la méthode d'extraction d'ADN directe sur membrane filtrante est faible (ρ de Spearman = 0,26 ; $P = 0,018$). Cette faible efficacité est peut-être due au protocole d'extraction d'ADN directe à partir de la membrane filtrante qui n'est peut-être pas tout à fait au point, car aucun résultat positif n'a été observé pour les échantillons d'eau contenant les plus grandes quantités de *Campylobacter* (> 110,02

MPN/L). Il est certain que le protocole de qRT-PCR précédée d'un enrichissement décrit dans cette étude est légèrement plus long à réaliser (environ deux jours de travail) comparativement aux protocoles de quantification sans enrichissement déjà publiés (environ un jour de travail) par SKANSENG *et al.*, 2006 et par DEBRETSION *et al.*, 2007, par exemple, et c'est probablement pour cette raison que l'équipe de VAN DYKE *et al.*, 2006 n'avait pas inclus une étape d'enrichissement, justement pour rendre la technique plus rapide à réaliser. Cependant, si aucune étape d'enrichissement n'est faite, cela signifie que les 5 µl d'extrait d'ADN qui sont utilisés dans la réaction de RT-PCR représentent une dilution de 1/80 sur le volume de 2000 ml initial à analyser, ce qui équivaut à analyser seulement un volume de 25 ml d'échantillon d'eau. Il est important de rappeler que l'extraction d'ADN réalisée avec la trousse « DNeasy® Blood and Tissue » de Qiagen produit un extrait d'un volume total de 400 µl. Donc, sachant que la limite de détection de la RT-PCR est de 3 à 10 bactéries par réaction de RT-PCR, s'il y a moins de 40 cellules de *Campylobacter* (mortes et/ou vivantes) par litre dans l'échantillon de 2000 ml d'eau, ce qui équivaut à moins de 1 cellule par 25 ml d'échantillon d'eau, il est normal que la méthode de VAN DYKE *et al.*, 2006 déclare ces échantillons négatifs et ce, même si, en réalité, ils contiennent du *Campylobacter*. Quoi qu'il en soit, pour le moment, il est possible d'affirmer que la qRT-PCR précédée d'un enrichissement est une méthode plus efficace que l'extraction d'ADN directe à partir de la membrane filtrante.

Finalement, à ma connaissance, cette étude est la première qui permet de constater que l'extrapolation de la quantité initiale de cellules de *Campylobacter* avant enrichissement et ce, à partir d'un résultat quantitatif obtenu suite à un enrichissement, semble possible. Il faut cependant garder à l'esprit qu'aucune méthode n'est parfaite et

que la RT-PCR est sujette à différents événements comme l'inhibition partielle ou totale, la contamination ou encore le mauvais fonctionnement d'une réaction, ce qui, dans chacun des cas, falsifierait les résultats.

Pour conclure, les cours d'eau sont une activité récréative très populaire et un lieu de convergence privilégié de la vie sociale, ce qui fait en sorte que, chaque année des milliers de consommateurs et de plaisanciers s'exposent, inconsciemment, au danger qu'est le *Campylobacter*. Il faut toujours garder à l'esprit que le *Campylobacter* est une menace très présente dans l'eau environnementale et que non seulement la détection, mais également la quantification du *Campylobacter* sont des aspects important à considérer pour le suivi de la qualité de l'eau, car ils pourraient permettre de bâtir des lignes directrices permettant d'évaluer le risque pour la consommation humaine d'eau ou l'utilisation de l'eau à des fins récréatives et ce, en plus de permettre aux futures études épidémiologiques d'évaluer l'impact et l'ampleur que la charge bactérienne peut causer au niveau de la santé humaine, animale et environnementale.

Perspectives

Il sera donc nécessaire de refaire l'étude du tracé des courbes de croissance de différents isolats de *C. jejuni*, de *C. coli* et de *C. lari* préalablement stressés et enrichis dans les mêmes conditions que pour l'isolat de *C. jejuni* testé dans cette étude, afin de s'assurer que les trois espèces de *Campylobacter*, pouvant être détectées par la RT-PCR incluse dans le protocole de qRT-PCR précédée d'un enrichissement, produisent une phase de latence et un temps de génération similaires et ce, dans les mêmes conditions de cultures.

Il sera également intéressant de bâtir trois courbes standards avec des étalons (10^0 à 10^8 bactéries) de souches de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* qui ont subi tout le processus d'enrichissement et d'analyses par qRT-PCR précédée d'un enrichissement. Il faudra donc vérifier la quantité réelle de Campylobacter formant les étalons avant et après tout le processus d'enrichissement et d'analyses par qRT-PCR précédée d'un enrichissement avec, par exemple, la méthode de dénombrement direct par microscope à épifluorescence avec des cellules préalablement colorées au « 4',6' di-amidino-2-phényl indole » (DAPI), comme il a été fait dans les travaux de McDANIELS *et al.*, 2005 et SKANSENG *et al.*, 2006. Ceci permettra également de s'assurer que le *C. coli* et le *C. lari* forment une courbe standard semblable à celle obtenue pour *C. jejuni*.

Il faudrait également faire une étude complémentaire avec des échantillons d'eau environnementale naturellement contaminés, mais cette fois-ci, avec l'utilisation de témoins positifs de Campylobacter d'une quantité connue dans tous le processus d'enrichissement et d'analyses par qRT-PCR précédée d'un enrichissement. Cette étude complémentaire permettrait de pouvoir mettre au point une RT-PCR quantitative plutôt que semi-quantitative.

Il sera également nécessaire de développer un contrôle interne avec de l'ADN provenant d'un organisme dont les chances de le retrouver dans de l'eau environnementale soient presque inexistantes et ce, afin de s'assurer du bon fonctionnement de la réaction de qRT-PCR, comme il a été fait par PERELLE *et al.*, 2004.

Il pourrait aussi être intéressant d'affiner la qRT-PCR précédée d'un enrichissement en permettant également de faire la distinction entre *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* et ce, en plus de la quantification. Il serait intéressant de s'inspirer des travaux de JENSEN *et al.*, 2005, qui ont développé un protocole de RT-PCR permettant uniquement la distinction, et non la quantification comme dans notre cas, entre *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* et *C. upsaliensis*.

Il sera nécessaire de vérifier si la RT-PCR a pu subir de l'inhibition partielle en vérifiant les Ct obtenus pour tous les échantillons négatifs additionnés de 1 µl d'extrait d'ADN de la souche *C. jejuni* ATCC 33560 d'une concentration de $6,25 \times 10^4$ bactéries/ml. En effet, si les Ct de ces échantillons ne sont pas tous sensiblement les mêmes, cela pourra signifier qu'il y a eu inhibition partielle de la RT-PCR.

CONCLUSION

L'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrée a été la ligne directrice de cette maîtrise. Elle a permis, d'observer que le *Campylobacter* était retrouvé dans les cours d'eau de l'Estrée tout au long de l'année, mais plus particulièrement en automne. Elle a permis de constater que le *Campylobacter* pouvait être retrouvé en grande quantité (110,02 à 604,52 MPN/L) et qu'une année n'était pas représentative d'une autre. Elle a permis d'observer une faible corrélation entre la prévalence hebdomadaire du *Campylobacter* et des coliformes thermotolérants (ρ de Spearman = 0,27 ; $P = 0,008$) et entre la quantité de ces deux microorganismes (τ -b de Kendall = 0,233 ; $P < 0,0001$). De plus, pour chaque tranche de température analysée dans cette étude, la proportion des échantillons d'eau positifs pour le *Campylobacter* était statistiquement différente de celle des coliformes thermotolérants et du *E. coli* ($P < 0,02$). D'un autre côté, pour chacun des trois microorganismes étudiés, la proportion des échantillons d'eau positifs augmentait légèrement lorsque les niveaux de turbidité augmentaient de 0-5 NTU à 26-50 NTU et, au-dessus de ces niveaux, la présence du *Campylobacter* était significativement moins fréquente que celle des coliformes thermotolérants et du *E. coli* (Khi-carré, $P = 0,0001$). Également, plus de 150 échantillons d'eau de puits privés (de surface et artésien) situés en Estrie ont été gracieusement analysés au cours de cette étude. De ces analyses, 5 échantillons d'eau de puits de surface sur 53 étaient positifs pour *C. jejuni* et seulement deux d'entre eux étaient aussi positifs pour les coliformes thermotolérants. Ces résultats suggèrent que les indicateurs de pollution

fécale, comme les coliformes thermotolérants, ne sont pas suffisant pour correctement évaluer la présence et/ou la quantité du *Campylobacter* dans l'eau environnementale. L'investigation du rôle de l'eau environnementale comme source sporadique d'infection à *Campylobacter* nécessitera l'utilisation de techniques de surveillance plus spécifiques. Les résultats de cette grande étude ont pu faire l'objet d'un article scientifique ayant comme titre « Thermotolerant coliforms are not a good surrogate for *Campylobacter* in environmental water », soumis pour publication le 26 Février 2009.

Dans un deuxième temps, la multitude d'isolats récoltés lors de l'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrée, ainsi que les lacunes contenues dans les méthodes d'identification à l'espèce du *Campylobacter* déjà publiées, ont inspiré le développement d'une approche moléculaire d'identification à l'espèce du *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* et *C. fetus* basée sur trois techniques, c'est-à-dire la PCR hippurate, la PCR 16S et la PCR-RFLP. Pour le moment, l'approche moléculaire permettrait d'éviter la mauvaise identification à l'espèce de 508 isolats de *Campylobacter* et la mauvaise identification au genre de 18 isolats qui n'étaient pas du *Campylobacter*, ce qui ferait un total de 526/1950 isolats (27%) préalablement mal identifiés par les tests biochimiques seuls. À elle seule, la PCR hippurate a permis d'identifier correctement 225/1950 (12%) isolats de *C. jejuni* donnant un résultat négatif au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube et de confirmer 1385/1950 (71%) isolats donnant un résultat positif au test d'hydrolyse de l'hippurate de sodium en tube. La PCR-RFLP a produit 14 profils de digestion dont 8 profils semblent être associé à une seule espèce de *Campylobacter* en particulier. Pour l'instant, l'approche moléculaire n'aurait toutefois pas pu identifier correctement à l'espèce 35/1950 isolats (1,8%) de *Campylobacter*, dont 1/1950 isolat

(0,05%) qui n'a donné qu'un profil de digestion partiel et non-interprétable. Très récemment, nous avons appris que la technique de séquençage du gène *cpn60* décrite par HILL *et al.*, 2006 avait été suggérée, en 2008, par le « Clinical and Laboratory Standards Institute » (CLSI) (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2008) pour l'identification à l'espèce du *Campylobacter*. Ainsi, il est projeté d'utiliser cette technique de séquençage du gène *cpn60* afin de confirmer l'identification à l'espèce des isolats de *Campylobacter* problématiques et des isolats autre que *C. jejuni* contenus dans cette étude. Cette approche moléculaire a permis de confirmer la nécessité d'utiliser plus d'une technique afin de s'assurer de l'identification à l'espèce adéquate du *Campylobacter*, car présentement il n'existe aucune technique fiable à 100%.

Dans un troisième temps, la présence soutenue et la forte concentration occasionnelle du *Campylobacter* détectées dans les eaux environnementales de l'Estrie en 2005-2007, ont porté à se questionner sur l'utilité de développer une méthode rapide et efficace de détection et de quantification du *Campylobacter* dans l'eau. De cette réflexion et des difficultés qu'a entraînées l'utilisation de la méthode MPN lors de l'étude de prévalence et de quantification du *Campylobacter* dans les eaux environnementales de l'Estrie, est né un protocole de qRT-PCR précédée d'un enrichissement pour la quantification de *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* dans l'eau. Ainsi, ce projet a permis de constater qu'un enrichissement de 16 h, dans du bouillon Preston, à une température de 42°C, en micro-aérobie, permet d'augmenter le nombre de cellules d'un isolat de *C. jejuni* contenu dans un échantillon d'eau naturellement contaminé par un facteur relativement constant (temps de génération moyen de 62 ± 17 min) et ce, peu importe la condition cellulaire initiale testée dans ce projet et

occasionnée par un séjour dans de l'eau environnementale. Ce dernier fait est renforcé par l'observation d'une moyenne 10 fois (varie entre 0,8 et 1,2 \log_{10}) plus élevée de cellules d'un isolat de *C. jejuni* après un enrichissement de 15 h lorsque l'inoculum initial théorique était de 1000 bactéries comparativement à 100 bactéries. Finalement, il a été possible de constater que, de façon générale, peu importe le type de stress subi par les cellules infectieuses d'un isolat de *C. jejuni* au cours de cette étude, elles semblent toutes générer la même durée de phase de latence (5 h) et la réaction de RT-PCR incluse dans le protocole a une limite de détection très acceptable évaluée entre 3 et 10 bactéries par réaction de RT-PCR. De plus, les résultats obtenus via le protocole de RT-PCR semi-quantitatif sont comparables à la quantification obtenue via la méthode MPN (rho de Spearman = 0,84 ; $P < 0,001$), ce qui permet de croire que ce protocole simple pourrait éventuellement être un choix envisageable pour la détection et la quantification du *Campylobacter* dans l'eau.

Finalement, ces trois projets de maîtrise tentent de faire réaliser qu'il semble y avoir une nécessité de réévaluer les critères et les protocoles pour la surveillance de la qualité de l'eau de consommation et de l'eau à des fins récréatives. Pour ce faire, chacun à leur façon, ces trois projets permettent de constater à quel point la menace du *Campylobacter* est considérable et qu'il est nécessaire et possible de trouver des solutions concrètes, réalistes et peu coûteuse, afin de pouvoir ultimement mettre en place des mesures efficaces de prévention des infections à *Campylobacter*. Ces outils permettront également de mieux comprendre les routes de transmission de la campylobactériose, ce qui aidera à déterminer quels sont les facteurs de risques et quels sont les sources probables de *Campylobacter* et ce, afin de protéger la santé publique.

REMERCIEMENTS

L'obtention du grade de Maître ès sciences est l'accomplissement d'une passion qui avait pour alliés un désir de se questionner, de réfléchir, de formuler des hypothèses, de trouver des solutions, d'être capable de communiquer et de confronter ses idées sans peur ni regrets, d'imaginer, de créer, d'expérimenter, d'avoir de la patience et surtout, un désir d'apprendre de ses erreurs, mais également de ses réussites.

Cette passion a été entretenue, tout au long de ma maîtrise, par deux personnes dynamiques qui croyaient en l'importance et en l'utilité de leur travail. Il est donc tout naturel de remercier chaleureusement mes deux co-directeurs de recherche, le Dr. Sophie Michaud et M. Eric Frost, Ph. D., pour leur accueil, leur disponibilité, leur encadrement et surtout leur aide et leurs précieux conseils. Vous m'avez donné la chance et le plaisir de travailler sur des projets stimulants et ce, en compagnie de personnes extraordinaires qui, avec le temps, sont devenus des amis et pour cela, je vous en suis très reconnaissante.

Je tiens à remercier profondément les membres de mes deux laboratoires et plus particulièrement M. Simon Lévesque, Mme. Sylvie Deslandes, M. Sc., et Mme. Isabelle Ménard. Je vous remercie tous pour votre aide, vos conseils, votre disponibilité, votre patience, votre vitalité, votre motivation et pour l'accueil chaleureux que vous m'avez accordé.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du projet CampyloGIS, plus particulièrement M. André Lavoie, Ph. D., et M. Djoan Bonfils, ainsi que tous les membres du département de microbiologie et d'infectiologie qui ont contribué de près ou de loin à rendre mon passage à la maîtrise enrichissant et avec lesquels des discussions agréables, mobilisatrices et fructueuses ont eu lieu. Je tiens aussi à remercier M. Benoit Chabot, Ph. D., pour avoir gracieusement mis à ma disposition son thermocycleur LightCycler 1.2 de Roche et Mme. Michele Van Dyke, Ph. D., et M. Peter Huck, Ph. D., de l'Université de Waterloo pour avoir gracieusement partagé leur protocole d'extraction d'ADN directe à partir de la membrane filtrante.

Un merci tout spécial aux membres de mon jury, Dr. Sophie Michaud, M. Eric Frost, Ph. D., M. Louis-Charles Fortier, Ph. D., et Mme. Carole Beaulieu, Ph. D., qui ont participé à la correction de mon mémoire.

Un merci unique et ardent à mon confident et amour Alexandre, qui m'a épaulé et soutenu tout au long de ma maîtrise et avec qui j'ai eu le privilège de partager mes joies, mes peines et mon expérience.

Finalement, la recherche est un travail d'équipe qui demande la collaboration et l'énergie de dizaines de personnes qui malheureusement oeuvrent bien souvent dans l'ombre. Ces gens, des personnes dévouées, des collègues de travail, des amis sincères, sont un pilier de la recherche et font, à leur façon, une différence. Je profite donc de l'occasion pour remercier de tout coeur Mme. Maya Zabinski, M. Feridoon Zokeai Arani, M. Normand Laframboise, Mme. Carole Picard, Mme. Sylvie Carrier,

Mme. Nathalie Carrier, Mme. Lise Imbault, Mme. Sherry Bellam, Mme. Catherine Desrosiers, Mme. Nicole Malandain, M. Emile Raymackers, M. Réjean Boislard, M. Jocelyn Beaucher, Mme. Chantal Létourneau, M. Alexandre Chammat, Mme. Samia Halit, M. Denis Deslauriers, M. Raphaël Sansregret, Mme. Maude Lizotte, Mme. Mélissa René, Mme. Mylène Lévesque, Mme. Suzanne Gascon, Mme. Miriam M. Sabourin, Mme. Caroline Laroche, Mme. Andrée-Ann Boily, Mme. Marie-Andrée Nadeau, Mme. France Leblanc, M. Dave Boucher et Mme. Ariane Gagnon.

« Ce n'est pas le titre qui honore l'homme, mais l'homme qui honore le titre »

Nicolas Machiavel

RÉFÉRENCES

Abulreesh, H. H., T. A. Paget, and R. Goulder. 2006. *Campylobacter* in waterfowl and aquatic environments: incidence and methods of detection. *Environ Sci Technol* **40**: 7122-31.

Agence de santé publique du Canada. 28 juillet 2008, date de révision. Maladies à déclaration obligatoire en direct. [En ligne]. Agence de santé publique du Canada, Ottawa, Canada. http://dsol-smed.phac-aspc.gc.ca/dsol-smed/ndis/index_f.html.

Alfredson, D. A. and V. Korolik. 2007. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol Lett* **277**: 123-32.

Allerberger, F., N. Al-Jazrawi, P. Kreidl, M. P. Dierich, G. Feierl, I. Hein, and M. Wagner. 2003. Barbecued chicken causing a multi-state outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis. *Infect* **31**:19-23.

Altekruse, S. F., N. J. Stern, P. I. Fields and D. L. Swerdlow. 1999. *Campylobacter jejuni*-an emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis* **5**: 28-35.

Anonymous. 2000. Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal water supply, Walkerton, Ontario, May-June 2000. *Can Commun Dis Rep* **26**:170-3.

Arvanitidou, M., G. A. Stathopoulos, T. C. Constantinidis, and V. Katsouyannopoulos. 1995. The occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. in river and lake waters. *Microbiol Res* **150**:153-8.

Asakura, M., W. Samosornsuk, A. Hinenoya, N. Misawa, K. Nishimura, A. Matsuhisa and S. Yamasaki. 2008. Development of a cytolethal distending toxin (cdt) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**: 260-6.

Basic Local Alignment Search Tool. 2008. BLAST. [Online]. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Rockville Pike, Bethesda. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Bhavsar, S. P., M. Baserisalehi and B. P. Kapadnis. 2004. Effect of gamma radiation on survival of campylobacters in various food samples. *Indian J Med Microbiol* **22**: 39-43.

Black, R. E., M. M. Levine, M. L. Clements, T. P. Hughes, and M. J. Blaser. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis* **157**: 472-9.

Black, R.E., D. Perlman, M. L. Clements, M. M. Levine, and M. J. Blaser. 1992. Human volunteer studies with *Campylobacter jejuni*. In: I. Nachamkin, M. J. Blaser, D. S. Tompkins (ed), *Campylobacter jejuni: Current status and future trends*. Washington, D. C.

Blaser, M. J. 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J Infect Dis* **176 Suppl 2**:S103-5.

Blaser, M. J., H. L. Hardesty, B. Powers, and W. L. Wang. 1980. Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in biological milieus. *J Clin Microbiol* **11**:309-13.

Blaser, M. J., D. N. Taylor, and R. A. Feldman. 1983. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. *Epidemiol Rev* **5**:157-76.

Bolla, J. M. and E. Garnotel. 2008. Human *Campylobacter* infections. *Revue Francophone des Laboratoires* **400**: 27-35.

Bolton, F. J., D. Coates, D. N. Hutchinson, and A. F. Godfree. 1987. A study of thermophilic campylobacters in a river system. *J Appl Bacteriol* **62**:167-76

Bolton, F. J., P. M. Hinchliffe, D. Coates, and L. Robertson. 1982. A most probable number method for estimating small numbers of campylobacters in water. *J Hyg (Lond)* **89**:185-90.

Brennhovd, O., G. Kapperud, and G. Langeland. 1992. Survey of thermotolerant *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in three surface water sources in Norway. *Int J Food Microbiol* **15**:327-38.

Cardarelli-Leite, P., K. Blom, C. M. Patton, M. A. Nicholson, A. G. Steigerwalt, S. B. Hunter, D. J. Brenner, T. J. Barrett and B. Swaminathan. 1996. Rapid identification of *Campylobacter* species by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *J Clin Microbiol* **34**: 62-7.

Carter, A. M., R. E. Pacha, G. W. Clark, and E. A. Williams. 1987. Seasonal occurrence of *Campylobacter* spp. in surface waters and their correlation with standard indicator bacteria. *Appl Environ Microbiol* **53**: 523-6.

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. 2005. Recherche et dénombrement des coliformes fécaux (thermotolérants) et confirmation à l'espèce *Escherichia coli*: méthode par filtration sur membrane. In: Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, MA. 700-Fec. Ec 1.0, Rév. 2. 20p.

Clark, C. G., L. Price, R. Ahmed, D. L. Woodward, P. L. Melito, F. G. Rodgers, F. Jamieson, B. Ciebin, A. Li, and A. Ellis. 2003. Characterization of waterborne outbreak-associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario. *Emerg Infect Dis* **9**: 1232-41.

Clarridge, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clin Microbiol Rev **17**: 840-62.

Clinical and laboratory standards institute. 2008. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; Approved Guideline. CLSI document MM18-A. Wayne, Pennsylvania, USA. 88 pages.

Comité provincial sur l'entérite à Campylobacter au Québec. 1999. L'entérite à Campylobacter au Québec: état de situation et propositions d'action. Comité provincial sur l'entérite à Campylobacter au Québec. Québec, Canada.

Conseil national de recherche Canada. 28 juillet 2008, date de révision. Entrevue avec Martin Young, Ph. D. [En ligne]. Conseil national de recherche Canada, Ottawa, Canada. http://ghi-igs.nrc-cnrc.gc.ca/humanpathintervi_f.html

Corry, J. E. L., D. E. Post, P. Colin and M. J. Laisney. 1995. Culture media for the isolation of campylobacters. Int J Food Microbiol **26**: 43-76.

Crotty, P. L., R. A. Staggs, P. T. Porter, A. A. Killeen and R. C. McGlennen. 1994. Quantitative analysis in molecular diagnostics. Hum Pathol **25**: 572-9.

Dams, E., L. Hendriks, Y. Van de Peer, J.-M. Neefs, G. Smits, I. Vandenbempt and R. De Wachter. 1988. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. Nucleic Acids Research, supplement **16**: 87-173.

Debretsion, A., T. Habtemariam, S. Wilson, D. Nganwa and T. Yehualaeshet. 2007. Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Campylobacter jejuni* on chicken rinses from poultry processing plant. *Mol Cell Probes* **21**: 177-81.

De Martinis, E. C., R. E. Duvall and A. D. Hitchins. 2007. Real-time PCR detection of 16S rRNA genes speeds most-probable-number enumeration of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* **70**: 1650-5.

Denis, M., C. Soumet, K. Rivoal, G. Ermel, D. Blivet, G. Salvat and P. Colin. 1999. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett Appl Microbiol* **29**: 406-10.

Développement durable, Environnement et Parcs Québec. January 16, 2008, revision date. Fiche technique sur le portrait général de l'eau potable en Estrie. [Online]. Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Québec, Canada. <http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/inter.htm>.

Dingle, K. E., F. M. Colles, D. R. A. Wareing, R. Ure, A. J. Fox, F. E. Bolton, H. J. Bootsma, R. J. L. Willems, R. Urwin, and M. C. J. Maiden. 2001a. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* **39**: 14-23.

Dingle, K. E., F. M. Colles, R. Ure and al. 2001b. The population structure of *Campylobacter jejuni* is shaped by genetic recombination in combination with selection. In: Microbiology IJoM, ed. 11th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and related Organisms. Freiburg, Germany: Urban and Fischer. Page 63.

Dingle, K. E., F. M. Colles, R. Ure and al. 2001c. Clonal complexes of the zoonotic human pathogen *Campylobacter jejuni* have associations with antigens and source of isolation. In: Microbiology IJoM, ed. 11th International Journal of Medical Microbiology. Freiburg, Germany: Urban & Fisher. Pages 63-64.

Dorner, S. M., W. B. Anderson, T. Gaulin, H. L. Candon, R. M. Slawson, P. Payment, P. M. Huck. 2007. Pathogen and indicator variability in a heavily impacted watershed. *J Water Health* **5**: 241-57.

Drake, J. W., B. Charlesworth, D. Charlesworth and J. F. Crow. 1998. Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics* **148**: 1667-86.

Drancourt, M., C. Bollet, A. Carlouz, R. Martelin, J. P. Gayral, and D. Raoult. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* **38**: 3623–30.

Duim, B., P. A. Vandamme, A. Rigter, S. Laevens, J. R. Dijkstra and J. A. Wagenaar. 2001. Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. *Microbiology* **147**: 2729-37.

Duim, B., J. A. Wagenaar, J. R. Dijkstra, J. Goris, H. P. Endtz and P. A. Vandamme. 2004. Identification of distinct *Campylobacter lari* genogroups by amplified fragment length polymorphism and protein electrophoretic profiles. Appl Environ Microbiol **70**: 18-24.

Endtz, H. P., G. J. Ruijs, B. van Klingeren, W. H. Jansen, T. van der Reyden and R. P. Mouton. 1991. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. J Antimicrob Chemother **27**: 199-208.

Endtz, H. P., J. S. Vliegenthart, P. Vandamme, H. W. Weverink, N. P. van den Braak, H. A. Verbrugh and A. van Belkum. 1997. Genotypic diversity of *Campylobacter lari* isolated from mussels and oysters in The Netherlands. Int J Food Microbiol **34**: 79-88.

Everest, P. H., H. Goossens, J. P. Butzler, D. Lloyd, S. Knutton, J. M. Ketley and P. H. Williams. 1992. Differentiated Caco-2 cells as a model for enteric invasion by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. J Med Microbiol **37**: 319-25.

Eyles, R., D. Niyogi, C. Townsend, G. Benwell, and P. Weinstein. 2003. Spatial and temporal patterns of *Campylobacter* contamination underlying public health risk in the Taieri River, New Zealand. J Environ Qual **32**: 1820-8.

Fermer, C. and E. O. Engvall. 1999. Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* and *C. upsaliensis*. J Clin Microbiol **37**: 3370-3.

Friedman, C., J. Neimann, C. Wegener, and R. Tauxe. 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations, p. 121-138. In I. Nachamkin and M. J. Blaser (ed.), *Campylobacter*, 2nd Edition ed. ASM Press, Washington, DC.

Frost, E. H., S. Deslandes, D. Bourgaux-Ramoisy, and P. Bourgaux. 1995. Quantitation of *Chlamydia trachomatis* by culture, direct immunofluorescence and competitive polymerase chain reaction. Genitourin Med **71**:239-43.

Galanis, E. 2007. *Campylobacter* and bacterial gastroenteritis. CMAJ **177**: 570-1.

Garrity G. M., D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. T. Staley. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2: The proteobacteria; Part C: The alpha, Beta, Delta and Epsilonproteobacteria. 2nd ed. Springer US, USA. 1388 pages.

GenPoint, A. S. 2007, date d'utilisation. Bugs'n BeadsTM version S. GenPoint. 4 pages.

Gillespie, I. A., S. J. O'Brien, J. A. Frost, G. K. Adak, P. Horby, A. V. Swan, M. J. Painter, and K. R. Neal. 2002. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses. *Emerg Infect Dis* **8**:937-42.

González, A., Y. Moreno, R. González, J. Hernández and M. A. Ferrús. 2006. Development of a simple and rapid method based on polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate *Helicobacter*, *Campylobacter*, and *Arcobacter* species. *Curr Microbiol* **53**: 416-21.

González, J. M. 1996. A general purpose program for obtaining Most Probable Number tables. *J Microbiol Methods* **26**: 215-8.

Gorkiewicz, G., G. Feierl, C. Schober, F. Dieber, J. Köfer, R. Zechner and E. L. Zechner. 2003. Species-specific identification of campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* **41**: 2537-46.

Greisen, K., M. Loeffelholz, A. Purohit and D. Leong. 1994. PCR Primers and Probes for the 16S rRNA Gene of Most Species of Pathogenic Bacteria, Including Bacteria Found in Cerebrospinal Fluid. *J Clin Microbiol* **32**: 335-51.

Groupe scientifique sur l'eau. 2003. Coliformes fécaux. In: Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine. Institut national de santé publique du Québec. 3 pages.

Hani, E. K. and V. L. Chan. 1995. Expression and characterization of *Campylobacter jejuni* benzoylglycine amidohydrolase (hippuricase) gene in *Escherichia coli*. J Bacteriol **177**: 2396-2402.

Hanninen, M. L., H. Haajanen, T. Pummi, K. Wermundsen, M. L. Katila, H. Sarkkinen, I. Miettinen, and H. Rautelin. 2003. Detection and typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and analysis of indicator organisms in three waterborne outbreaks in Finland. Appl Environ Microbiol **69**:1391-1396.

Health Canada. 2006. Guidelines for Canadian drinking water quality: Guideline technical document - Bacterial waterborne pathogens - Current and emerging organisms of concern. Water Quality and Health Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada.

Heijnen, L. and G. Medema. 2006. Quantitative detection of *E. coli*, *E. coli* O157 and other shiga toxin producing *E. coli* in water samples using a culture method combined with real-time PCR. J Water Health **4**: 487-98.

Hill, J. E., A. Paccagnella, K. Law, P. L. Melito, D. L. Woodward, L. Price, A. H. Leung, L. K. Ng, S. M. Hemmingsen and S. H. Goh. 2006. Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified *cpn60* sequences and comparison to CpnDB, a chaperonin reference sequence database. J Med Microbiol **4**: 393-9.

Holler, C. 1988. Quantitative and qualitative studies of *Campylobacter* in a sewage treatment plant. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B] **185**: 326-39.

Horman, A., R. Rimhanen-Finne, L. Maunula, C. H. von Bonsdorff, N. Torvela, A. Heikinheimo, and M. L. Hanninen. 2004. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. Appl Environ Microbiol **70**: 87-95.

Humphrey, T., S. O'Brien and M. Madsen. 2007. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. Int J Food Microbiol **117**: 237-57.

Hutchinson, D. N., F. J. Bolton, P. M. Hinchliffe, H. C. Dawkins, S. D. Horsley, E. G. Jessop, P. A. Robertshaw, and D. E. Counter. 1985. Evidence of udder excretion of *Campylobacter jejuni* as the cause of milk-borne *Campylobacter* outbreak. J Hyg (Lond) **94**:205-15.

Inglis, G. D., B. M. Hoar, D. P. Whiteside and D. W. Morck. 2007. *Campylobacter canadensis* sp. nov., from captive whooping cranes in Canada. Int J Syst Evol Microbiol **57**: 2636-44.

Janda, J. M. and S. L. Abbott. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. J Clin Microbiol **45**: 2761-4.

- Jensen, A. N., M. T. Andersen, A. Dalsgaard, D. L. Baggesen and E. M. Nielsen.** 2005. Development of real-time PCR and hybridization methods for detection and identification of thermophilic *Campylobacter* spp. in pig faecal samples. J Appl Microbiol **99**: 292-300.
- Jones, I. G., and M. Roworth.** 1996. An outbreak of *Escherichia coli* O157 and campylobacteriosis associated with contamination of a drinking water supply. Public Health **110**:277-82.
- Jones, K.** 2001. Campylobacter in water, sewage and the environment. J Appl Microbiol **90**: 68-79.
- Karenlampi, R. I., T. P. Tolvanen and M.-L. Hanninen.** 2004. Phylogenetic analysis and PCR-restriction fragment length polymorphism identification of *Campylobacter* species based on partial groEL gene sequence. J Clin Microbiol **42**: 5731-8.
- Kawasaki, S., P. M. Fratamico, I. V. Wesley and S. Kawamoto.** 2008. Species-specific identification of campylobacters by PCR-restriction fragment length polymorphism and PCR targeting of the gyrase B gene. Appl Environ Microbiol **8**: 2529-33.
- Kindaichi, T., Y. Kawano, T. Ito, H. Satoh and S. Okabe.** 2006. Population dynamics and in situ kinetics of nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by real-time quantitative PCR. Biotechnol Bioeng **94**: 1111-21.

Kodaka, H., G. L. Lombard and V. R. Jr. Dowell. 1982. Gas-liquid chromatography technique for detection of hippurate hydrolysis and conversion of fumarate to succinate by microorganisms. *J Clin Microbiol* **16**: 962-4.

Koenraad, P. M. F. J., F. M. Rombouts, and S. H. W. Notermans. 1997. Epidemiological aspects of thermophilic *Campylobacter* in water-related environments: A review. *Water Environ Res* **69**: 52-63.

Konkel, M. E., D. J. Mead, S. F. Hayes and W. Jr. Cieplak. 1992. Translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarized epithelial cell monolayer cultures. *J Infect Dis* **166**: 308-15.

Konkel, M. E., S. G. Garvis, S. L. Tipton, D. E. Jr. Anderson and W. Jr. Cieplak. 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* **24**: 953-63.

Kos, V. N., A. Gibreel, M. Keelan and D. E. Taylor. 2006. Species identification of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates and optimization of a duplex PCR for rapid detection. *Res Microbiol* **157**: 503-7.

Krause, M., M. H. Josefsen, M. Lund, N. R. Jacobsen, L. Brorsen, M. Moos, A. Stockmarr and J. Hoorfar. 2006. Comparative, collaborative, and on-site validation of a Taqman PCR method as a tool for certified production of fresh, *Campylobacter*-free chickens. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5463-8.

Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögren, L. Strömbom, A. Ståhlberg and N. Zoric. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* **27**: 95-125.

Kuusi, M., J. P. Nuorti, M. L. Hanninen, M. Koskela, V. Jussila, E. Kela, I. Miettinen, and P. Ruutu. 2005. A large outbreak of campylobacteriosis associated with a municipal water supply in Finland. *Epidemiol Infect* **133**: 593-601.

Lamoril, J., N. Ameziane, J. C. Deybach, P. Bouizegarène and M. Bogard. 2008. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* **23**: 260-79.

Lang, T. A., and M. Secic. 1997. How to report statistics in medicine: annotated guidelines for authors, editors and reviewers. American College of Physicians, Philadelphia, PA.

Legoff J., H. Bouhlal, G. Grésenguet, H. Weiss ,N. Khonde, H. Hocini, N. Désiré, A. Si-Mohamed, J. D. Longo, C. Chemin, E. Frost, J. Pépin, J. E. Malkin, P. Mayaud and L. Bélec. 2006. Real-Time PCR Quantification of Genital Shedding of Herpes Simplex Virus (HSV) and Human Immunodeficiency Virus (HIV) in Women Coinfected with HSV and HIV. *J Clin Microbiol* **44**: 423-32.

Levesque, S., E. Frost, R. D. Arbeit and S. Michaud. 2008. Multilocus Sequence Typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk and environmental water in Quebec. J Clin Microbiol **46**:3404-11.

Lévesque, S., K. St-Pierre, E. Frost, and S. Michaud. 2005. Determination of the optimal culture conditions for detecting *Campylobacter* spp. in environmental water, 13th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms, Gold Coast, Queensland, Australia.

Linton, D., A. J. Lawson, R. J. Owen and J. Stanley. 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. J Clin Microbiol **35**: 2568-72.

Lior, H. 1984. New, Extended Biotyping Scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and "*Campylobacter laridis*". J Clin Microbiol **20**: 636-40.

Liss, B., O. Franz, S. Sewing, R. Bruns, H. Neuhoff and J. Roeper. 2001. Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. The EMBO Journal **20**: 5714-25.

Love, J. L., P. Scholes, B. Gilpin, M. Savil, S. Lin and L. Samuel. 2006. Evaluation of uncertainty in quantitative real-time PCR. J Microbiol Methods **67**: 349-56.

Lubeck, P. S., P. Wolffs, S. L. On, P. Ahrens, P. Radstrom, and J. Hoorfar. 2003. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant campylobacters: assay development and analytical validation. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5664-9.

MacFaddin, J. F. 2000. Biochemical test for identification of medical bacteria. Lippincott Williams & Wilkins. 3rd ed. USA. 912 pages.

Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman and B. G. Spratt. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3140-5.

Marshall, S. M., P. L. Melito, D. L. Woodward, W. M. Johnson, F. G. Rodgers and M. R. Mulvey. 1999. Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* **12**: 4158-60.

Martikainen, P. J., L. Korhonen, and T. U. Kosunen. 1990. Occurrence of thermophilic campylobacters in rural and urban surface waters in Central Finland. *Water Res* **24**:91-96.

Matsuda, M. and J. E. Moore. 2004. Urease-Positive Thermophilic *Campylobacter* Species. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4415-8.

- McDaniels, A. E., L. Wymer, C. Rankin and R. Haugland.** 2005. Evaluation of quantitative real time PCR for the measurement of *Helicobacter pylori* at low concentrations in drinking water. *Water Res* **39**: 4808-16.
- Megraud, F.** 1987. Diagnostic bactériologiques des infections à *Campylobacter*. *Revue Française Des Laboratoires* **156**: 2-16.
- Megraud, F., D. Chevrier, N. Desplaces, A. Sedallian and J. L. Guesdon.** 1988. Urease-Positive Thermophilic *Campylobacter* (*Campylobacter laridis* Variant) Isolated from an Appendix and from Human Feces. *J Clin Microbiol* **26**: 1050-1.
- Merritt, A., R. Miles, and J. Bates.** 1999. An outbreak of *Campylobacter* enteritis on an island resort, north Queensland. *Commun Dis Intell* **23**: 215-9; discussion 220.
- Michaud, S., S. Ménard, R. D. Arbeit.** 2004. *Campylobacteriosis*, Eastern Townships, Québec. *Emerg Infect Dis* **10**: 1844-7.
- Mignard, S. and J. P. Flandrois.** 2006. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J Microbiol Methods* **67**: 574–81.
- Miller, W. G., S. L. W. On, G. Wang, S. Fontanoz, A. J. Lastovica and R. E. Mandrell.** 2005. Extended Multilocus Sequence Typing System of *Campylobacter coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* and *C. helveticus*. *J Clin Microbiol* **43**: 2315-29.

Moat, A. G., J. W. Foster and M. P. Spector. 2002. Microbial physiology. Wiley-Liss. 4th ed. New York, USA. 715 pages.

Moore, J. E., D. Corcoran, J. S. Dooley, S. Fanning, B. Lucey, M. Matsuda, D. A. McDowell, F. Megraud, B. C. Millar, R. O'Mahony, L. O'Riordan, M. O'Rourke, J. R. Rao, P. J. Rooney, A. Sails, and P. Whyte. 2005. *Campylobacter*. Vet Res **36**: 351-82.

Moore, J. E., P. S. Caldwell, B. C. Millar, and P. G. Murphy. 2001. Occurrence of *Campylobacter* spp. in water in Northern Ireland: implications for public health. Ulster Med J **70**:102-7.

Moreno, Y., S. Botella, J. L. Alonso, M. A. Ferrús, M. Hernández and J. Hernández. 2003. Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. Appl Environ Microbiol **69**: 1181-6.

Morio, F., S. Corveca, N. Caroff, F. Le Gallou, H. Drugeon and A. Reynaud. 2008. Real-time PCR assay for the detection and quantification of *Legionella pneumophila* in environmental water samples: Utility for daily practice. Int J Hyg Environ Health **211**: 403-11.

Morris, G. K., M. R. El Sherbeeney, C. M. Patton, H. Kodaka, G. L. Lombard, P. Edmonds, D. G. Hollis and D. J. Brenner. 1985. Comparison of four hippurate hydrolysis methods for identification of thermophilic *Campylobacter* spp. J Clin Microbiol **22**: 714-8.

Morrison, T. B., J. J. Weis and C. T. Wittwer. 1998. Quantification of Low-Copy Transcripts by Continuous SYBR Green I Monitoring during Amplification. BioTechniques **24**: 954-62.

Murray P. R, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller and R. H. Tenenbaum. 2003. Manual of Clinical Microbiology. American Society For Microbiology. 8th ed. USA. 2322 pages.

Nachamkin, I. 2003. Campylobacter and Arcobacter, p. 902-914. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, J. H. Jorgensen, and R. H. Tenenbaum (ed.), Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Nachamkin, I., M. J. Blaser and L. S. Tompkins. 1992. *Campylobacter jejuni*, Current Status and Future Trends. American Society For Microbiology. 1st ed. United States of America. 300 pages.

Nachamkin, I., M. J. Blaser. 2000. Campylobacter. American Society For Microbiology. 2nd ed. United States of America. 545 pages.

Nakari, U. M., A. Puhakka and A. Siitonen. 2008. Correct identification and discrimination between *Campylobacter jejuni* and *C. coli* by a standardized hippurate test and species-specific polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**: 513-8.

National Center for Biotechnology Information. 2005. NCBI. [Online]. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Rockville Pike, Bethesda. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Neefs, J.-M., Y. Van de Peer, L. Hendriks and R. De Wachter. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, supplement **18**: 2237-317.

New Zealand Food Safety Authority. January 16, 2008, revision date. *Campylobacter*. [Online]. New Zealand Food Safety Authority, Wellington, New Zealand. <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets>.

Nylen, G., F. Dunstan, S. R. Palmer, Y. Andersson, F. Bager, J. Cowden, G. Feierl, Y. Galloway, G. Kapperud, F. Megraud, K. Molbak, L. R. Petersen and P. Ruutu. 2002. The seasonal distribution of campylobacter infection in nine European countries and New Zealand. *Epidemiol Infect* **128**: 383-90.

Obiri-Danso, K., and K. Jones. 1999. Distribution and seasonality of microbial indicators and thermophilic campylobacters in two freshwater bathing sites on the River Lune in northwest England. *J Appl Microbiol* **87**:822-32.

On, S. L. 1996. Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. Clin Microbiol Rev **9**: 405-22.

On, S. L. and P. J. Jordan. 2003. Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Clin Microbiol **41**: 330-6.

Patel, J. B. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Mol Diagn **6**:313–321.

Pebody, R. G., M. J. Ryan, and P. G. Wall. 1997. Outbreaks of Campylobacter infection: rare events for a common pathogen. Commun Dis Rep CDR Rev **7**:R33-7.

Pei, Z., C. Burucoa, B. Grignon, S. Baqar, X. Z. Huang, D. J. Kopecko, A. L. Bourgeois, J. L. Fauchere and M. J. Blaser. 1998. Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. Infect Immun **66**: 938-43.

Penner, J. L. 1988. The genus Campylobacter: a decade of progress. Clin Microbiol Rev **1**: 157-72.

Perelle, S., M. Josefsen, J. Hoorfar, F. Dilasser, J. Grout and P. Fach. 2004. A LightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic Campylobacter. Mol Cell Probes **18**: 321-7.

Poitras, E. and A. Houde. 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. Rev Biol Biotech **2**: 2-11.

Poly, F. and P. Guerry. 2008. Pathogenesis of *Campylobacter*. Curr Opin Gastroenterol **24**: 27-31.

Poppert, S., M. Haas, T. Yildiz, T. Alter, E. Bartel, U. Fricke and A. Essig. 2008. Identification of thermotolerant *Campylobacter* species by fluorescence in situ hybridization. J Clin Microbiol **46**: 2133-6.

Prescott, Harley and Klein. 1995. Microbiologie. DeBoeck Université. 1st ed. Bruxelles, Belgique. 1014 pages.

Qiagen. 2006a. Critical factors for successful Real-Time PCR. Integrated solutions - Real-Time PCR applications. Nanogen. 47 pages.

Qiagen. 2006b. DNeasy® Blood & Tissue Handbook. Qiagen. 59 pages.

Robinson, D. A. 1981. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. Br Med J (Clin Res Ed) **282**: 1584.

Rollins, D. M., and R. R. Colwell. 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl Environ Microbiol **52**: 531-8.

Ronner, A. C., E. O. Engvall, L. Andersson and B. Kaijser. 2004. Species identification by genotyping and determination of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from humans and chickens in Sweden. *Int J Food Microbiol* **96**: 173-9.

Rose, J. B., and C. P. Gerba. 1991. Use of risk assessment for development of microbial standards. *Water Sci Technol* **24**: 23.

Rudi, K., H. K. Hoidal, T. Katla, B. K. Johansen, J. Nordal and K. S. Jakobsen. 2004. Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. *Appl Environ Microbiol* **70**: 790-7.

Said, B., F. Wright, G. L. Nichols, M. Reacher, and M. Rutter. 2003. Outbreaks of infectious disease associated with private drinking water supplies in England and Wales 1970-2000. *Epidemiol Infect* **130**:469-79.

Sails, A. D., A. J. Fox, F. J. Bolton, D. R. Wareing and D. L. Greenway. 2003. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1383-90.

Savill, M. G., J. A. Hudson, A. Ball, J. D. Klena, P. Scholes, R. J. Whyte, R. E. McCormick, and D. Jankovic. 2001. Enumeration of *Campylobacter* in New Zealand recreational and drinking waters. *J Appl Microbiol* **91**: 38-46.

Schuster, C. J., A. G. Ellis, W. J. Robertson, D. F. Charron, J. J. Aramini, B. J. Marshall and D. T. Medeiros. 2005. Infectious Disease Outbreaks Related to Drinking Water in Canada, 1974-2001. *Can J Public Health* **96**: 254-8.

Sheppard, S. K., N. D. McCarthy, D. Falush and M. C. J. Maiden. 2008. Convergence of *Campylobacter* species: Implications for bacterial evolution. *Science* **320**: 237-9.

Siemer, B. L., E. M. Nielsen and S. L. W. On. 2005. Identification and molecular epidemiology of *Campylobacter coli* isolates from human gastroenteritis, food, and animal sources by amplified fragment length polymorphism analysis and Penner serotyping. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1953-8.

Skanseng, B., M. Kaldhusdal and K. Rudi. 2006. Comparaison of chicken gut colonisation by the pathogens *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* by real-time quantitative PCR. *Mol Cell Probes* **20**: 269-79.

Skirrow, M. B., R. G. Fido, and D. M. Jones. 1981. An outbreak of presumptive food-borne *Campylobacter* enteritis. *J Infect* **3**:234-6.

Skjerve, E., and O. Brennhovd. 1992. A multiple logistic model for predicting the occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in water. *J Appl Bacteriol* **73**:94-8.

Slater, E. R. and R. J. Owen. 1997. Restriction fragment length polymorphism analysis shows that the hippuricase gene of *Campylobacter jejuni* is highly conserved. Lett Appl Microbiol **25**: 274-8.

Stehr-Green, J. K., C. Nicholls, S. McEwan, A. Payne, and P. Mitchell. 1991. Waterborne outbreak of *Campylobacter jejuni* in Christchurch: the importance of a combined epidemiologic and microbiologic investigation. N Z Med J **104**: 356-8.

Steinhauserova, I., J. Ceskova, K. Fojtikova and I. Obrovskaa. 2001. Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. J Appl Microbiol **90**: 470-5.

Stelzer, W., H. Mochmann, U. Richter, and H. J. Dobberkau. 1989. A study of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in a river system. Zentralbl Hyg Umweltmed **189**:20-8.

Stonnet, N. J. and J. L. Guesdon. 1993. *Campylobacter jejuni*: specific oligonucleotides and DNA probes for use in polymerase chain reaction-based diagnosis. FEMS Immunol Med Microbiol **7**: 337-44.

St-Pierre, K., S. Levesque, E. Frost, N. Carrier, R. D. Arbeit and S. Michaud. *Soumis pour publication.* Thermotolerant coliforms are not a good surrogate for *Campylobacter* in environmental water. Appl Environ Microbiol.

Tauxe, R. V. 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations, p. 9-19. *In* I. Nachamkin, M. J. Blaser, and L. S. Tompkins (ed.), *Campylobacter jejuni* - current status and future trends. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Teunis, P., A. Havelaar, J. Vliegthart, and G. Roessink. 1997. Risk assessment of *Campylobacter* species in shellfish: Identifying the unknown. *Water Sci Technol* **35**: 29-34.

Teunis, P., W. Van Den Brandhof, M. Nauta, J. Wagenaar, H. Van Den Kerkhof and W. Van Pelt. 2005. A reconsideration fo the *Campylobacter* dose-response relation. *Epidemiol Infect* **133**: 583-592.

Thomas, C., H. Gibson, D. J. Hill, and M. Mabey. 1999. *Campylobacter* epidemiology: an aquatic perspective. *J Appl Microbiol Symp* **85**: 168S-177S.

Thomas, M. K., S. E. Majowicz, P. N. Sockett, A. Fazil, F. Pollari, K. Dore, J. A. Flint, and V. L. Edge. 2006. Estimated Numbers of Community Cases of Illness Due to *Salmonella*, *Campylobacter* and Verotoxigenic *Escherichia coli*: Pathogen-specific Community Rates. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **17**: 229-34.

Till, D., G. McBride, A. Ball, K. Taylor, and E. Pyle. 2008. Large-scale freshwater microbiological study: rationale, results and risks. *J. Water Health.* **6**: 443-460.

Tse, C. and J. Capeau. 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann Biol Clin* **61**: 279-93.

Tsushima, I., T. Kindaichi and S. Okabe. 2007. Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR. *Water Res* **41**: 785-94.

Van Bergen, M. A., K. E. Dingle, M. C. Maiden, D. G. Newell, L. Van Der Graaf-Van Bloois, J. P. Van Putten, J. A. Wagenaar. Clonal nature of *Campylobacter fetus* as defined by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* **43**: 5888-98.

Van Dyke, M. I., V. Morton, W. B. Anderson, J. L. Isaac-Renton and P. M. Huck. 2006. The occurrence of bacterial and protozoan pathogens in the Grand River watershed. Proceedings, 12th Canadian National Conference & 3rd Policy Forum on Drinking Water. Saint-John. New Brunswick. Pages 51-68.

Van Vliet, A. H. M. and J. M. Ketley. 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *J Appl Microbiol* **90**: 45S-56S.

Voet, D. and J. G. Voet. 1998. Biochimie. DeBoeck Université. 2^e ed. Paris, France. 1361 pages.

Vogt, R. L., H. E. Sours, T. Barrett, R. A. Feldman, R. J. Dickinson, and L. Witherell. 1982. *Campylobacter* enteritis associated with contaminated water. *Ann Intern Med* **96**: 292-6.

Waldenstrom, J., T. Broman, I. Carlsson, D. Hasselquist, R. P. Achterberg, J. A. Wagenaar, and B. Olsen. 2002. Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds. *Appl Environ Microbiol* **68**:5911-7.

Wang, G., C. G. Clark, T. M. Taylor, C. Pucknell, C., Barton, L. Price, D. L. Woodward. and F. G. Rodgers. 2002. Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol* **40**: 4744-4747.

Wilson, K. H., R. B. Blitchington and R. C. Greene. 1990. Amplification of Bacterial 16S Ribosomal DNA with Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* **28**: 1942-6.

Wolffs, P. F. G., K. Glencross, B. Norling and M. W. Griffiths. 2007. Simultaneous quantification of pathogenic *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken rinse fluid by a flotation and real-time multiplex PCR procedure. *Int J Food Microbiol* **117**: 50-4.

Wong, M. L. and J. F. Medrano. 2005. Real-time PCR for mRNA quantification. *BioTechniques* **39**: 1-11.

Woo, P. C. Y., K. H. I. Ng, S. K. P. Lau, K. T. Yip, A. M. Y. Fung, K. W. Leung, D. M. W. Tam, T. L. Que and K. Y. Yuen. 2003. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J Clin Microbiol* **41**: 1996–2001.

World Health Organization. January 16, 2008, revision date. Water-related diseases. [Online]. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/campylobacteriosis/en/index.html.

Yang, C., Y. Jiang, K. Huang, C. Zhu and Y. Yin. 2003. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**: 265-71.

Yang, C., Y. Jiang, K. Huang, C. Zhu, Y. Yin, J. H. Gong, and H. Yud. 2004. A Real-time PCR Assay for the Detection and Quantitation of *Campylobacter jejuni* using SYBR Green I and the LightCycler. *Yale J Biol Med* **77**: 125-32.